UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 803

LES FACTEURS DE LA COAGULATION SANGUINE ET LE COMPLÉMENT

Étude de leur rapport par la Streptokinase

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 mars 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

HANS OCHSNER
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
CH. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 803

LES FACTEURS DE LA COAGULATION SANGUINE ET LE COMPLÉMENT

Étude de leur rapport par la Streptokinase

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 mars 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

HANS OCHSNER
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
CH. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ⊛
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

DOYEN HONORAIRE :

M. VOLMAR O. ✻, C. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, ✻, I. ✪, O. ⊛	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ⊛	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ⊛	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ⊛ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ⊛, ✪	Sciences naturelles
	MÉTAIS (chargé des fonctions)	Sciences appliquées
	N.	Sciences naturelles
	N.	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

M.	MALGRAS	Bactériologie
Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
MM.	LAUSTRIAT	Chimie et Physique
	MATHIS, CARBIENER, STAHL (chargés des fonctions)	Chimie
		Histoire naturelle
		Bactériologie et Parasitologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A MA FEMME

INTRODUCTION

Dans son travail FREY (1) a pu constater *que la Streptokinase occasionne un processus de lyse réelle*, fournissant la preuve qu'elle n'agit pas par une inhibition ou une action frénatrice de la coagulation sanguine. Il a pu constater qu'il existe un rapport quantitatif entre les doses de Streptokinase employées et l'évolution des tracés thrombographiques enregistrant les processus de coagulation.

Récemment SLÄTIS (2) a prouvé que la synthèse de la *Prothrombine* et de la *Proconvertine* s'effectue dans le tissu réticulo-endothélial; d'autre part, FUCHS a établi pour la première fois la proche parenté entre la *Prothrombine* et le *Complément*. Des travaux antérieurs de FELIX, BENDL et ROKA (3), de MARX, BAYERLE et SKIPPE (4), de VINET et MEUNIER (5) corroborent cette relation *entre la Prothrombine et le Complément*, tout en admettant une nette différence constitutionnelle. Ce fait a été étudié tout récemment par R. SARTORY, J. MEYER et leurs élèves. Étant donné que dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, FREY a pu confirmer que la Streptokinase doit être considérée comme un *antigène vrai*, donnant naissance à un anticorps spécifique, *l'Antistreptokinase*, c'est en nous basant sur ses déductions que nous avons entrepris nos travaux *pour élucider l'influence de la Streptokinase, enzyme streptococcique, sur les protéines du sérum, le Complément et ses quatre chaînons, et sur la Prothrombine.*

Dans ces dix dernières années, *la Streptokinase* a pris une grande importance thérapeutique, consécutive à la découverte de TILLET et GARNER (6). *La Streptokinase* est capable de dissoudre la fibrine humaine; plusieurs préparations, telles que *la Varidase* ou *la Dornokinase* ont fait leur apparition dans la médecine humaine, pour fluidifier des exsudats purulents ou fibrineux. On a bientôt remarqué que *la Streptokinase* influence défavorablement d'autres protéines de l'organisme, *telles que le Fibrinogène, la Prothrombine et le Complément*, mais peu de recherches ont été effectuées à ce sujet. Cependant, les injections intraveineuses de *cette enzyme streptococcique* peuvent avoir des conséquences fâcheuses, soit par la production de phénomènes allergiques secondaires, soit par l'instauration d'une hypocoagulabilité du sang et, par un traitement prolongé, une hypercoagulabilité et enfin en diminuant les processus de défense anti-infectieuse de l'organisme.

Nous avons par conséquent essayé de contrôler, dans notre travail, *l'influence de la Streptokinase sur le Complément et sur la Prothrombine* « *in vitro* ». Nous espérons ainsi pouvoir apporter des éléments intéressants pour l'étude de ces phénomènes « *in vivo* ».

En ce qui concerne le mécanisme d'action de la Streptokinase sur la fluidification et la lyse d'un coagulum de fibrine, nous connaissons actuellement les faits suivants :

La Streptokinase est capable de catalyser un proactivateur existant à un taux élevé dans le sang humain. Le nouvel activateur ainsi engendré transforme *la Profibrinolysine* inactive en *Fibrinolysine*, ferment actif, qui d'après les travaux de CHRISTENSEN (7) et d'ASTRUP (8) occasionne la lyse du coagulum fibrineux et d'après PILLEMER, inhibe le pouvoir alexique.

Le sang et le sérum d'un certain nombre d'animaux (singes, lapins, chiens, cobayes) ne contiennent que peu ou pas du tout de Profibrinolysine apte à être activée par la Streptokinase. Chez l'enfant, le taux de Profibrinolysine est relativement faible.

Si nous pouvons établir, au cours de nos recherches, que la Streptokinase est capable d'inactiver le Complément ou la Prothrombine, il nous incombera de déterminer si cette réaction s'effectue également par un processus catalytique, transformant la Profibrinolysine en Fibrinolysine, ou si l'on a affaire à un autre mécanisme réactionnel. Pour résoudre ce problème, deux possibilités se sont offertes à nous :

— *L'inactivation du Complément doit faire défaut dans les sérums ne contenant pas de Profibrinolysine activable.*

— *Inversement, l'addition de Fibrinolysine du commerce au sérum à tester doit provoquer une inactivation du Complément.*

Nous savons d'autre part que le Complément est constitué par quatre chaînons et nous voulons mettre en évidence, dans notre travail, lequel d'entre eux est inactivé par la Streptokinase ou dans quel ordre cette inactivation a lieu.

Pour le dosage du Complément, nous nous sommes adressé à des hématies de mouton sensibilisées; le contrôle de la lyse a été effectué au moyen du *photocolorimètre électrique Lumetron* par détermination du taux d'hémolyse à 50 % d'après ROULIER (9).

En ce qui concerne la mesure du taux de Prothrombine, nous avons eu recours à la *méthode de Quick*, en nous servant du *bain-marie électromagnétique Paris-Labo.*

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous tenons à exprimer notre plus vive reconnaissance à Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous fait le grand honneur de présider notre Jury de thèse.

Nous remercions également Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre gratitude va à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, qui, après nous avoir suggéré le thème de notre travail, nous a toujours guidé avec bonté au cours de son élaboration.

Nous voudrions remercier également le *Centre de Transfusion de Strasbourg*, ainsi que Monsieur J. MALGRAS, *Chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, qui nous ont procuré le sang qui nous était indispensable pour nos travaux.

PLAN DE TRAVAIL

Nous nous sommes proposé d'étudier « *in vitro* » l'influence de la Streptokinase sur deux protéines sériques : le Complément et la Prothrombine.

Notre travail se divise en deux parties; dans la *partie historique*, le Chapitre premier a trait à l'étude du Complément, de ses chaînons et de leurs relations réciproques.

Le Chapitre deuxième est réservé à la coagulation du sang, plus particulièrement en ce qui concerne la *Prothrombine* et son rapport avec le *Complément*.

Dans le Chapitre troisième nous décrivons succinctement le mécanisme de la fibrinolyse. Nous insistons sur les différents activateurs de la *Profibrinolysine* et étudions le mode d'action de la *Streptokinase*. Puis nous donnons un court aperçu sur l'origine et l'emploi thérapeutique de la *Streptokinase* et de la *Streptodornase*.

La deuxième partie de notre exposé concerne nos *travaux personnels*. Nous résumons dans le Chapitre quatrième les bases de la mesure quantitative de l'activité hémolytique au moyen du Lumetron.

Dans le Chapitre cinquième nous donnons la méthode de dosage du Complément dans le sérum de l'homme et du cobaye.

Le Chapitre sixième est réservé à l'étude de *l'influence de la Streptokinase sur le sérum humain et de cobaye*, en rapport avec la durée de contact et la température de la réaction. Nous étudions également l'influence des ions Calcium sur le phénomène d'inactivation.

Le Chapitre septième a trait au contrôle de *l'influence de la Streptokinase ou de la Fibrinolysine sur les différents composants du Complément*.

Nous étudions ensuite, au moyen du bain-marie électromagnétique, *l'action éventuelle de la Streptokinase et de l'Hyaluronidase sur le taux de Prothrombine* des plasmas d'homme et de lapin.

Des *Conclusions Générales* terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LE COMPLÉMENT

L'origine du *Complément* et sa constitution ont préoccupé de nombreux chercheurs, mais ces problèmes sont encore loin d'être élucidés. Ainsi, nous ne savons rien de précis sur le lieu de formation du Complément.

Il est admis actuellement que *l'Alexine* se compose de quatre ou de cinq composants qui peuvent être élaborés dans divers organes. De nombreux auteurs se sont préoccupés de cette question. Moison (10) prétend que *le Complément* ne provient ni des érythrocytes, ni des leucocytes. Mandelbaum (11) par contre, pense que les fractions actives du *Complément* proviendraient des leucocytes. Maignon (12) prétend qu'elles proviendraient de la fixation de la *Trypsine* résorbée sur les globulines du sérum, *ce qui parlerait en faveur d'une composition homogène du Complément.* Il faut noter à ce sujet que l'administration buccale de Trypsine abaisse le taux du Complément sanguin du cobaye, ce qui contredit la théorie de Maignon.

Il y a plusieurs raisons d'admettre le foie comme lieu d'origine du Complément. Rice et Boulanger (13) provoquent une dégénérescence graisseuse du foie chez le cobaye par administration de Chloroforme, par exemple, et ils constatent ainsi un abaissement du taux de Complément. D'autres auteurs ont constaté les mêmes faits en provoquant des traumatismes du foie ou une sous-alimentation amenant surtout un manque de *Méthionine* et de *Cystine.* Schabinski a constaté qu'un traitement prolongé par la *Streptomycine*, comme par exemple dans la tuberculose, fait diminuer fortement le taux de Complément et celui-ci ne se normalise que plusieurs semaines après cessation de cette thérapie. L'auteur pense par conséquent que la diminution du Complément est due à l'intervention de la flore intestinale qui est largement modifiée par la Streptomycine. Il se rapporte à ce sujet à une observation de Büsing et Zuzak (14) qui ont constaté un abaissement du taux de Prothrombine et de Complément chez des poussins atteints d'*hypovitaminémie K.* Comme on le sait, les besoins en Vitamine K sont essen-

tiellement couverts par les *Colibacilles*, bactéries intestinales par excellence. D'après Gurwitz (15) le cobaye ne possède pas de Complément avant sa naissance. En soumettant des cobayes à une alimentation à base d'Acides aminés marqués par l'Azote radioactif ^{15}N on a pu démontrer que la vitalité du Complément ne durerait que quatre semaines environ. C'est donc une substance qui s'épuise et se régénère de façon constante. Cependant, toutes ces expériences ont été effectuées sur le Complément entier: comme il est peu probable que l'origine de la formation de ses différents composants soit la même, il serait intéressant de vérifier ces recherches, en tenant compte de ce fait. *On sait en effet que l'absence d'un seul chaînon du Complément supprime l'activité spécifique de celui-ci, c'est-à-dire l'hémolyse.* C'est pour cette raison que nous avons effectué nos recherches sur chacun des quatre composants du Complément.

Les composants du Complément:

Comme nous l'avons déjà dit, *le Complément a été considéré pendant très longtemps comme un corps global, caractérisé par sa sensibilité au chauffage.* Actuellement, on connaît indubitablement l'existence de quatre fractions, dont aucune ne possède séparément les propriétés alexiques, alors que si on les réunit à nouveau on retrouve intégralement l'activité. Ces composants désignés : C'_1 C'_2 C'_3 et C'_4 peuvent être caractérisés par l'analyse qualitative et quantitative et aucun travail sur le Complément ne devrait plus être effectué sans en tenir compte.

Chaînon central et chaînon terminal:

En 1907, Ferrata a le premier fractionné le Complément en deux composants; Sachs (17) a confirmé ces résultats en diluant le sérum au moyen d'une solution d'HCl N/250 à la proportion de 1 8 à 1 10. Ces deux fractions ont été appelées « *chaînon central* » et « *chaînon terminal* » par rapport à leur possibilité de fixation sur l'antigène sensibilisé; on les a encore désignés comme « *composants globulinique et albuminique* » en se référant à leurs propriétés physico-chimiques respectives.

Le *chaînon central* n'est cependant pas équivalent à la fraction C'_1 puisqu'il contient encore de fortes traces des chaînons C'_3 et C'_1. Il en est de même pour le *chaînon terminal*, qui englobe principalement le C'_2, mais possède aussi une forte proportion de C'_4 et des traces de C'_3.

Si l'on traite le sérum par l'Acide chlorhydrique dilué comme nous venons de le dire, on obtient un précipité que l'on peut séparer par centrifugation, et qui est constitué par le *chaînon terminal:* il se dissout facilement dans le soluté physiologique légèrement alcalinisé. La solution ainsi obtenue est centrifugée, décantée, puis neutralisée et rendue isotonique. Ni l'un, ni l'autre de ces deux chaînons n'est apte à produire seul l'hémolyse, mais réunis ils retrouvent cette propriété.

Le fractionnement classique par précipitation au moyen de Sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation (respectivement à 33 %, 50 % et 100 %) ne permet pas d'obtenir les *chaînons central et terminal.* Les travaux d'Ecker (18) ont démontré que l'addition de 14 parties d'une solution de $(NH^1)^2SO^4$ — 2,4 N à une partie de sérum de cobaye appauvrit ce dernier de 35 % de ses *albumines totales*, occasionnant ainsi une perte de 90 % de ses propriétés alexiques. Cohn (19) et ses collaborateurs ont obtenu les résultats suivants : Par diffusion du Sulfate d'ammonium dans le sérum à travers une couche de cellophane, un maximum de 25 % de *globulines totales* du sérum participe à l'action complémentaire. La partie de *globulines insolubles* dans une solution de $(NH^4)^2$ SO^4 — 1,39 N contient toute la fraction appelée C'_1, alors que les *globulines solubles* dans cette solution, mais précipitables par une solution $(NH^4)^2$ SO^4 — 2 N ne contiennent plus que C'_3; d'autre part, la protéine soluble dans cette dernière solution de Sulfate d'ammonium et insoluble dans la solution 2,4 N contient les fractions C'_2 et C'_4.

L'électrophorèse montre que la globuline du chaînon central contient au moins quatre protéines différentes; cette fraction n'est pas seulement constituée par C'_1, mais contient encore un peu de C'_3 et de C'_4.

Propriétés des quatre composants du Complément:

L'activité du chaînon central est freinée ou inhibée par des groupements acides, tels que nous les trouvons dans l'*Héparine*, la *Germanine*, l'*Acide hyaluronique* et le *Liquoïde.* Ce chaînon possède les caractères d'une *euglobuline ;* il est très instable en soluté physiologique à $9^0/_{00}$, mais Brand (20) a pu démontrer qu'il devient très stable dès que cette solution est légèrement acidifiée. Il convient donc de conserver ce chaînon à un pH de 5,4 à 5,8. D'après différents auteurs, le chaînon C'_1 est le plus thermostable en solution tamponnée de pH = 7,3; il perd déjà son activité à 46° si le pH atteint 5,5.

Le *chaînon central* acquiert une certaine résistance thermique en présence d'hématies sensibilisées, ce qui lui permet de supporter sans dommage 56° pendant 30 à 60 minutes.

Le *composé terminal* serait, d'après Pillemer (21), une *muco-euglobuline* qu'il a isolée en dialysant le sérum contre de l'eau distillée pure. Ce chaînon est soluble dans une solution de Sulfate d'ammonium 2 N, alors qu'il est insoluble dans une solution 2,2 N. L'ultracentrifugat ne permet pas d'obtenir un produit homogène, puisqu'il possède également certaines propriétés du chaînon C'_4; *ces deux composants semblent avoir entre eux d'étroites relations et paraissent être tous les deux des complexes de protéines et d'hydrates de carbone.* Ils renferment à peu près trois fois plus de glucides que le chaînon C'_1. Ainsi, Pillemer n'a pas réussi à séparer chimiquement ces deux composants muco-euglobuliniques.

En irradiant le sérum avec des *rayons ultra-violets*, les chaînons thermolabiles C'_1 et C'_2 seront détruits et seuls les deux autres chaînons subsisteront.

Le chaînon terminal renferme tout le composant C'_2, une grande partie de C'_4 et des traces de C'_3. La survie des chaînons C'_3 et C'_4 dans les *composants central et terminal* dépend largement du mode de préparation de ces fractions. En général, le composant central renferme plus de chaînon C'_3, tandis que le composant terminal contient plus de C'_4.

Le chaînon-levure :

L'existence des deux autres constituants du Complément, c'est-à-dire des chaînons C'_3 et C'_4 a été démontrée par *leur thermostabilité plus prononcée* jusqu'à une température de 56°. En effet, le sérum de cobaye, traité par le *venin de Cobra* perd son pouvoir alexique, mais si l'on y ajoute par la suite une trace de sérum normal inactivé pendant 30 minutes à 56°, le mélange des deux sérums redevient hémolytique vis-à-vis des hématies sensibilisées. *Ce facteur inactivable par le venin de Cobra et thermostable constitue le chaînon* C'_3. Il peut être identifié de plusieurs manières, notamment en mettant en contact pendant 75 minutes, à la température du laboratoire, 1 cc de sérum de cobaye et 0,4 cc de dilution de venin de Cobra à 0,16 % dans du soluté physiologique. *Si l'on chauffe le Complément à* 56° *pendant* 30 *minutes avant de faire intervenir le venin de Cobra, ce dernier n'agit plus.* Il faut donc le chaînon C'_1 pour que le venin de Cobra adsorbe le chaînon C'_3. Ce fait peut être prouvé par l'addition de sérum frais et dans ces conditions, l'inactivation du composant C'_3 est cinq fois plus rapide à 37° que si l'on ajoute le venin au même sérum frais, à l'état initial.

Ce chaînon C'_3 n'est identique à aucun autre chaînon alexique existant dans le sérum frais. Il est détruit dans les sérums traités à différentes concentrations d'Acide chlorhydrique et neutralisation consécutive. Il peut être absorbé par le Phosphate tricalcique et détruit par l'Héparine. Il résiste à la dessiccation et à l'extraction par des solvants organiques tels que l'alcool, l'éther ou l'acétone. Son activité est diminuée en solution hypertonique. On prépare le chaînon C'_3 par précipitation au moyen d'une solution $(NH^4)^2SO^4$ à 50 %. *On peut également le préparer par extraction à partir du sérum en traitant ce dernier à la Levure.* Pour ce faire, on ajoute à 1 cc de sérum de cobaye 5 cc de suspension de Levure à 1 %. Après un contact de 75 minutes à la température du laboratoire on centrifuge.

Pour Coca (22) l'inactivation du Complément par la Levure est due à l'adsorption d'un des composants du sérum, qui ne serait autre que le chaînon C'_3. *Ce composant peut être régénéré comme dans le cas de l'inactivation par le venin de Cobra, par addition d'une trace de sérum inactivé par la chaleur.*

Pillemer et Ecker ont réussi à préparer à partir de la *Levure fraîche* un produit insoluble dans l'eau, qui ne contient que 0,54% d'Azote et qu'ils ont appelé *Zymosan*. Ce produit possède toutes les propriétés des polysaccharides et représente environ 2 % du poids total de la Levure, tout en étant 25 fois plus actif que cette dernière en ce qui concerne son pouvoir inactivant sur le chaînon C'_3. De plus, on a constaté que le sérum de bœuf inactivé par la chaleur retrouve ses propriétés hémolytiques vis-à-vis d'hématies sensibilisées, si on l'additionne d'une trace de sérum frais de cheval, *à condition qu'il ne soit pas traité au préalable par le Zymosan.*

Le sérum inactivé par le Zymosan peut retrouver son activité par addition de traces de sérum traité préalablement par la chaleur; *il en ressort par conséquent que ce facteur actif ne peut être ni le chaînon central, ni le chaînon terminal, mais une substance thermostable survivant dans le sérum chauffé :* il s'agit du chaînon C'_3.

Pillemer et ses collaborateurs ont étudié à fond le processus d'inactivation de ce chaînon C'_3 et ont constaté la nécessité de la présence d'ions de Magnésium. Le taux normal du Magnésium dans le sérum suffit pour réaliser une action optimale du Zymosan. Si l'on chauffe un sérum humain normal pendant 30 minutes entre 48° et 52°, le chaînon C'_3 considéré comme thermostable ne peut plus être inactivé par le Zymosan. Ce fait prouve l'intervention d'une ou de plusieurs substances thermolabiles, à côté des ions magnésiens.

Il était indiqué de rechercher si les chaînons C'_1 et C'_2, thermolabiles, sont identiques à ces fractions sériques entrant en réaction, ou si le chaînon C'_4, sensible à l'Hydrazine et relativement thermostable, intervient aussi dans le processus d'inactivation du chaînon C'_3 par le Zymosan. Pillemer *et ses élèves ont pu constater, entre autres résultats, que le Zymosan est incapable d'inactiver le chaînon C'_4 d'un sérum inactivé à 52° en présence d'ions de Magnésium ;* ils ont utilisé à ce sujet les fractions sériques privées du chaînon C'_3 et que l'on désigne par le terme de R_3, (R = réactif). Il faut en conclure que les facteurs thermolabiles nécessaires pour l'inactivation du chaînon C'_3 par le Zymosan sont identiques aux chaînons C'_1 et C'_2. *L'inactivation du C'_3 par le Zymosan nécessite donc, en plus des ions magnésiens, les trois autres composants* C'_1, C'_2 et C'_4.

Il est intéressant de constater que malgré l'analogie entre l'inactivation du chaînon C'_3 par le Zymosan et le processus d'immuno-hémolyse, le chaînon C'_3 seul est inhibé par le Zymosan, tandis que tous les autres composants du Complément restent présents. Dans le processus d'hémolyse par contre, tous les composants sont détruits, sauf le chaînon C'_3.

Le chaînon C'_3, de même que C'_1, est relativement stable dans une solution légèrement acide, mais très instable en solution faiblement alcaline. *Le chaînon-levure est thermostable, mais peu résistant à la température, si le pH est faible.* Il résiste à la température de 50° si le pH est compris entre 6,6 et 7,3, mais il est entièrement inactivé dans ces conditions

entre 56° et 58°. L'inactivation du Complément par dilution du sérum au moyen d'eau est due à la disparition du chaînon C'_3. L'addition de Chlorure de sodium le stabilise et lorsque sa concentration atteint 5 % ou plus, le chaînon C'_3 n'est plus adsorbable par la Levure. *L'exposition à l'air du sérum occasionne en premier lieu la destruction du chaînon* C'_3.

Le chaînon-ammoniaque :

Whitehead et ses collaborateurs (23) ont étudié l'action des Lipases sur le Complément et ont trouvé que son inactivation était due non pas aux Lipases elles-mêmes, mais aux sels ammoniacaux accompagnant les substrats lipasiques. La propriété alexique d'un sérum peut donc être détruite par l'ammoniaque ou les amines (par exemple l'éthylamine). Pour préparer cette fraction alexique on opère de la manière suivante : A 1 cc de sérum de cobaye on ajoute 0,25 cc d'une solution de NH^3 N 6,5. Après un contact de 15 minutes à 37°, on neutralise par 0,25 cc d'une solution d'HCl N/6,5 puis on complète à 2 cc au moyen de soluté physiologique.

Après avoir inactivé le sérum par l'ammoniaque, celui-ci peut être réactivé par un autre sérum préalablement inactivé par la chaleur ou par perte du chaînon C'_3 après action du venin de Cobra ou du Zymosan. *Ce qui a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un quatrième chaînon, appelé chaînon-ammoniaque ou chaînon* C'_4, *relativement thermostable, surtout en l'absence de sels ;* il ne serait détruit par chauffage qu'aux environs de 58° à 62°, à la condition que le pH soit de 6.6 à 7.3. La conservation du chaînon C'_4 dépend beaucoup plus des variations du pH et de l'influence de la chaleur associées que des autres composants du Complément. Elle est en général plus difficile que pour les autres chaînons, mais on sait que le chaînon C'_4 résiste le mieux dans le sérum total, sans en connaître encore les raisons. Quelques auteurs avaient pensé que le composant C'_4 est lié au complexe lipoïdique du sérum. Pillemer a cependant montré que *ce chaînon est plutôt lié à la partie polysaccharidique du chaînon terminal.* En effet, les chaînons C'_2 et C'_4 se trouvent dans la même muco-euglobuline, quoiqu'étant de thermostabilité différente. Notons que par la précipitation au moyen des sels neutres ou du fractionnement alcoolique de Cohn, le chaînon C'_4 se trouve avec le composant C'_2 dans la partie *pseudoglobulinique.* Il peut être détruit également par les sels de Calcium, alors qu'il est parfaitement résistant au venin de Cobra. Sa fragilité vis-à-vis d'autres venins de serpents (vipère, bothrops) ainsi que vis-à-vis du venin d'abeille est connue.

Pillemer et ses collaborateurs ont recherché la cause de l'*inactivation* du chaînon C'_4 *par l'Ammoniaque.* Ils ont montré qu'elle n'est pas due simplement à l'alcalinisation, mais à une réaction chimique, dans laquelle le groupement NH^2 joue un rôle important. Ils pensent par conséquent que l'inactivation de ce chaînon est due à la transformation des groupements carbonyl-actifs se trouvant dans le composant C'_4 en fonction

structurale plus sensible. Ces auteurs font remarquer que *seul le groupement amine, capable de s'unir au groupement carbonyle*, inactive le chaînon C'_1 et que pour réaliser cette réaction, il faut des groupements NH^1. L'*Hydrazine* ayant deux fonctions NH^2, inactive le chaînon C'_4 en concentration deux fois moindre que l'Ammoniaque. Les groupements polaires qui donnent aux amines des propriétés acides ou oxydoréductrices, inhibent la propriété inactivante. *On suppose ainsi que les groupements amines agissent sur les groupements carbonyles par leur union avec les gluco-protéines du sérum.*

Relations entre les différents composants du Complément:

De nombreux auteurs se sont penchés sur le problème des relations entre les divers composants du Complément, et comme Bloch (24) le mentionne, les avis sont toujours partagés. Pour Kossowitz (25) les différents chaînons doivent intervenir dans l'ordre suivant, pour que l'hémolyse puisse se réaliser : hématies sensibilisées $\vdash C'_1 \vdash C'_4 \vdash C'_2 \vdash C'_3$.

Le composant C'_3 ne servirait, d'après cet auteur, que de *catalyseur*, car on le retrouve à la fin de l'hémolyse. Pillemer et ses collaborateurs ont constaté que des globules sensibilisés fixent en l'espace d'une heure, à la température de 1° et sans être hémolysés, tous les composants du Complément, sauf le chaînon C'_3. Le chaînon C'_4 n'agit que si C'_1 est fixé auparavant ou au moins en même temps que lui. Ainsi, la fixation du chaînon C'_4 ne peut se faire en l'absence du chaînon C'_1. Le chaînon C'_1 *thermostable* ne peut être fixé qu'en présence du composant *thermolabile* C'_1 et C'_2. Si l'on inactive C'_4 par l'Hydrazine ou si l'on élimine C'_3 par le Zymosan, la fixation des composants C'_1 et C'_2 ne paraît guère influencée. Celle des chaînons C'_1 et C'_4 à l'état isolé s'effectue aussi bien à 0° qu'à 37° et celle des chaînons séparés C'_2 et C'_3 seulement à 0°.

Jusqu'à présent, on n'a pas pu prouver avec certitude que le chaînon C'_3 est responsable de la lyse des hématies sensibilisées. Il est sûr que ce chaînon n'agit qu'après fixation des trois autres composants. Le chaînon essentiellement responsable de la fixation du Complément semble être C'_4. Ainsi l'hypothèse, admise pendant longtemps, que le chaînon C'_2 est l'agent principal de cette fixation, serait devenue caduque.

Pour d'autres auteurs, le chaînon central se fixerait en premier lieu, suivi du chaînon C'_4, puis des chaînons C'_1 et C'_3. Le chaînon C'_3 ne peut être fixé sans action préalable du chaînon terminal C'_1; cependant, celui-ci peut se fixer sans intervention de C'_3. Après fixation du Complément total, la mise en liberté des chaînons C'_3 et C'_4 est réalisable à 37° et à 0°, tandis que les chaînons C'_1 et C'_4 ne peuvent être libérés qu'à 0°.

Hegedius et Greiner (26) ont étudié les relations entre les composants du Complément de plusieurs variétés zoologiques. Ils ont employé

réciproquement comme réactifs les différents chaînons qu'ils avaient préalablement séparés. *Ils considèrent que l'action complémentaire n'est possible que lorsque tous les composants sont présents, et que le titre du Complément est fonction du composant qui s'y trouve au taux le plus bas.* D'autres auteurs pensent que dans un même sérum une activité anti-complémentaire coexiste avec l'action favorisante. Il est impossible de doser cette activité anticomplémentaire, puisqu'on ne peut saisir que l'action alexique totale par l'hémolyse. D'autre part, les composants du sérum de cobaye et ceux du sérum humain peuvent se remplacer mutuellement, mais on ignore encore jusqu'à quel point ces interversions sont possibles. D'autres auteurs encore ont montré que les chaînons C'_1, C'_2, C'_3 et C'_4 ne sont pas répartis dans les mêmes proportions dans les sérums des diverses espèces animales.

Si l'on ajoute un excès de trois différents chaînons dans un sérum, il est possible de doser l'activité du quatrième par le phénomène d'hémolyse. *De cette façon on a pu constater que le chaînon C'_3 limite l'activité complémentaire chez le cobaye, tandis que chez l'homme c'est le chaînon C'_2 qui remplit cet office.*

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR LA COAGULATION DU SANG

Le phénomène de la coagulation sanguine est extrêmement complexe et un nombre considérable de travaux, souvent contradictoires, lui a été consacré. Pour donner une explication simpliste, on peut admettre que la coagulation s'effectue en principe en trois phases :

Première phase: formation de la Thrombine:

Elle s'effectue par transformation de la proenzyme *Prothrombine* en *Thrombine active* par un processus enzymatique protéolytique. Cette réaction a lieu sous l'influence de la *Thrombokinase tissulaire*, nécessitant la présence *d'ions de Calcium* comme catalyseurs.

Deuxième phase: formation de la Fibrine:

Au cours de cette réaction le *Fibrinogène*, qui fait partie des macroglobulines plasmatiques, est transformé en *Fibrine*, réaction enzymatique due à l'enzyme activée *Thrombine*. Une partie de Thrombine est capable de transformer 100.000 parties de Fibrinogène en Fibrine.

Troisième phase: rétraction du caillot:

Ce processus est très probablement dû à un autre ferment, la *Rétractozyme*, produite par les thrombocytes.

Le temps de coagulation:

Dans le système vasculaire de l'organisme humain et animal des effets pathologiques peuvent se manifester, pouvant aboutir à des *thromboses* ou, au contraire, à des *hémorragies*. Ces deux phénomènes sont dus à une diminution ou une augmentation du temps de coagulation. D'habitude on définit le temps de coagulation par *le laps de temps qui s'écoule entre le traumatisme et la formation du caillot fibrineux*. Le temps de coagulation de l'homme est normalement d'environ 15 minutes.

Bases du dosage de la Prothrombine:

D'après la conception classique, quatre facteurs interviennent dans la coagulation; ce sont : le *Fibrinogène, la Prothrombine, la Thrombokinase et les ions de Calcium.* En se basant sur cette conception, QUICK (27) a élaboré sa technique de dosage de la Prothrombine dans le plasma. Cette réaction monophasée s'est avérée très utile pour déterminer cliniquement l'influence de la *Vitamine K et des dérivés de la Coumarine.*

La transformation de la Thrombine évolue relativement plus lentement que celle du Fibrinogène en Fibrine qui se réalise dans quelques secondes. En mesurant ces deux phénomènes par une réaction monophasée, comme QUICK le fait dans le dosage de la Prothrombine, on détermine la durée de la transformation de la Prothrombine en Thrombine en se basant sur la formation du caillot. On ne mesure donc pas le taux de Prothrombine proprement dit, mais la vitesse de formation de la Thrombine. On sait actuellement que cette dernière dépend encore de plusieurs autres facteurs. En effet, 1 % de la Prothrombine du plasma en expérience suffit pour amener en quelques secondes la coagulation totale du sang. Le dosage de la Prothrombine totale n'est donc pas possible et on ne peut déterminer que le temps de coagulation même en présence d'une dose de Thrombokinase optimale.

La Prothrombine:

D'après SEEGERS (28) la Prothrombine à l'état de pureté est une gluco-protéine stable, hydrosoluble, contenant 18 Acides aminés. Son poids moléculaire est d'environ 62.700; à l'électrophorèse, elle migre avec les α_1-globulines. Dans une solution saline à 0,1 mol. son point isoélectrique se situe à pH = 4,2, tandis que celui de la Thrombine est à 4,8. La Prothrombine déshydratée, possédant environ 1 000 U. mg de substance active, est composée de :

Soufre	0,96 %
Azote	13,57 %
Tyrosine	4,58 %
Tryptophane	3,33 %
Phosphore	néant.

QUICK a différencié deux sortes de Prothrombines : une Prothrombine B qui doit être considérée comme la Prothrombine ordinaire, diminuant par l'action de la Coumarine, et une Prothrombine A synthétisée surtout à partir de la Vitamine K. Cette dernière dépendrait très probablement d'un facteur labile qui disparaît du plasma au cours de la conservation. Ce phénomène serait responsable de l'augmentation du taux de Prothrombine des plasmas conservés. Elle n'est pas absorbée par l'Hydroxyde d'alumine, ni influencée par un traitement à la Coumarine.

Cependant, en considérant les données établies par Seegers qui prouvent l'unicité de la Prothrombine, Quick a abandonné sa théorie des deux Prothrombines et a identifié son composant A avec le facteur labile. Celui-ci a été identifié plus tard comme facteur V de Owren, et par suite comme facteur VI, connu comme très labile.

Lasch et Roka (29) ont essayé de déterminer le lieu et le mécanisme de formation de la Prothrombine; d'après eux, elle serait synthétisée par les mitochondries des cellules hépatiques. A ce sujet, nous voudrions citer encore quelques données chronologiques : La régénération de la Prothrombine exige environ 2 à 3 heures, tandis que celle du Fibrinogène ne demande que 10 à 30 minutes. La durée de vie des thrombocytes et par conséquent de la Prothrombine, est de deux à quatre jours. Ce laps de temps est probablement aussi valable pour le Fibrinogène.

Relations entre la Prothrombine et le Complément:

Fuchs et Falkenhausen (30) ont conclu à une identité du chaînon C'_1 du Complément et de la Prothrombine, au cours de leurs travaux expérimentaux. Büsing et Zuzak, en étudiant l'influence de la Vitamine K sur le Complément, ont constaté que les taux de Prothrombine et de Complément du poussin évoluent parallèlement avec l'âge. De plus, ils ont observé que la coagulabilité du sang et l'activité alexique sont inhibées par suite d'un traitement par la bile, l'Hirudine ou l'Héparine. Une hypovitaminose K diminuerait en même temps le taux de Prothrombine et celui du Complément. Ces constatations ont été confirmées par d'autres auteurs pour le cobaye.

Le temps de coagulation prolongé au maximum par la Liquémine est normalisé dans l'espace de trois heures par injection sous-cutanée de Vitamine K six heures après l'injection de Liquémine. Des expériences semblables sur le lapin n'ont pas donné le même résultat. Certains auteurs ne croient pas pouvoir admettre une parenté entre le Complément et la Prothrombine, malgré leur comportement identique dans les expériences de Fuchs. Ainsi, un traitement de huit jours au Dicoumarol n'a pas eu la même influence sur la prolongation du temps de Quick et sur l'activité du Complément chez le lapin. On a d'autre part pu adsorber la Prothrombine du plasma humain, de bœuf et de lapin sur l'Hydroxyde d'alumine et d'autres adsorbants, sans pour cela diminuer la fonction alexique.

Supposant que les composants essentiels du Complément et ceux du système de coagulation sont des protéines, Rice et Boulanger (31) ont examiné leurs rapports avec la synthèse des protéines dans le foie pathologique.

L'injection de Tétrachlorure de carbone ou de Chloroforme a occasionné chez le cobaye à la fois une diminution de l'activité alexique et de la coagulabilité du sang. Le traitement à l'*Éthionine*, qui freine la synthèse des protéines par action sur la Méthionine et occasionne une

dégénérescence graisseuse du foie, amène également une diminution du Complément chez le cobaye avec une hypocoagulabilité par insuffisance de Prothrombine et de Fibrinogène. Même dans les cas où le taux de protéines totales restait normal, les auteurs ont constaté une hypoglobulinémie augmentant sensiblement le rapport globulines /albumines.

Dans les cas où le traitement à l'Éthionine diminuait le taux des protéines totales, cette diminution touchait principalement les globulines. Les mêmes constatations sont valables pour le traitement au Tétrachlorure de carbone ou au Chloroforme. Ces auteurs croient que la dégénérescence graisseuse proprement dite n'intervient pas dans la diminution du Complément et des facteurs de la coagulation, puisque ces modifications ne se manifestent pas si l'on traite les cas de dégénérescence graisseuse au moyen du Cholestérol.

Des injections répétées de Cortisone n'avaient aucune influence sur le Complément et les facteurs de la coagulation de cobayes normaux ou présentant une activité alexique diminuée.

D'après ces expériences, il ne semble pas exister de relations entre la synthèse des protéines dans le foie, les modifications de l'activité alexique et le taux de Prothrombine. Il semble exister une certaine parenté entre la Prothrombine et le Complément, en ce qui concerne leur lieu de formation et leur constitution chimique.

C'est pour étudier ce fait que nous avons entrepris nos recherches au moyen de Streptokinase et de Fibrinolysine dont l'action sur le Complément et la Prothrombine pourrait peut-être élucider ce problème.

CHAPITRE III

GÉNÉRALITÉS SUR LA FIBRINOLYSE ET LA FIBRINOLYSINE

Sous le terme de fibrinolyse on désigne les processus réactionnels complexes occasionnant la fluidification du caillot de Fibrine. En 1933, TILLET et GARNER ont découvert que l'ultrafiltrat de culture de certaines souches de *Streptocoques* possédait la propriété de lyser, dans un temps relativement court, la Fibrine humaine. Ils ont admis que le produit actif, la *Fibrinolysine*, diffusait dans le milieu ambiant et provenait du métabolisme bactérien.

Pendant un certain temps on a cru que la *Fibrinolysine* était le seul facteur de l'action fibrinolytique. Cependant, les expériences de MILSTONE (32) ont prouvé que le processus de la fibrinolyse dépend encore d'un autre facteur sérique qui a reçu le nom de « *lytic factor* ». Ce profacteur inactif existant dans le sérum a été appelé *Plasminogène* ou *Profibrinolysine* et l'enzyme protéolytique activée a reçu le nom de *Plasmine* = *Fibrinolysine*. D'après les travaux de CHRISTENSEN (33) on sait qu'il existe encore un autre facteur, la *Streptokinase* qui, elle, participe à la conversion du *Plasminogène* en *Fibrinolysine*. Cette exotoxine des *Streptocoques* est un activateur du proferment. Par la suite, on a mis en lumière, à côté de cet activateur microbien, d'autres substances d'origines des plus variées qui transmettent au sérum normal des propriétés fibrinolytiques. Nous ne mentionnerons que le *Chloroforme*, l'*Epinéphrine*, l'*Éther*, etc.

En plus de ces substances chimiques, on connaît actuellement encore d'autres activateurs, intervenant dans le même sens, tels que : la *Fibrinokinase*, isolée à partir de tissu humain et animal, l'*Urokinase*, un principe protéolytique actif extrait des urines normales, puis un activateur sérique mis en évidence par LEWIS et FERGUSON (34) indépendant des *Kinases tissulaires*.

En résumé, nous pouvons expliquer la transformation du *Plasminogène en Fibrinolysine active* de la façon suivante : Il se trouve dans le plasma un proferment inactif, le *Plasminogène* ou *Profibrinolysine*, qui est transformé par l'intervention des différentes *Kinases* ci-dessus énumérées, en *Fibrinolysine* laquelle, dans le sérum normal, se trouve en équilibre avec un facteur antagoniste, l'*Antifibrinolysine*. La *Fibrinolysine* n'attaque pas seulement la *Fibrine et le Fibrinogène*, mais également la gélatine et la caséine. La *Fibrinokinase*, l'*Urokinase* et l'*activateur sérique* de FERGUSON sont des activateurs directs du *Plasminogène*,

tandis que la *Streptokinase* nécessite l'intervention d'un *facteur thermostable* toujours présent dans le sérum humain chauffé, dans le lait de femme et de vache et dans la salive humaine, et un *facteur thermolabile* qui a été décelé dans le sérum de cobaye, de lapin et de canard et ayant une certaine analogie avec *le chaînon central du Complément.*

D'après un certain nombre d'auteurs, le sérum de divers animaux ne contient pas ce *proactivateur* ou alors le renferme en dose insuffisante de sorte que l'activation de la *Fibrinolysine par la Streptokinase* ne peut avoir lieu. Au cours de nos travaux, nous aurons l'occasion de démontrer que l'influence de la *Streptokinase sur la Prothrombine et le Complément* est également due au *Plasminogène (Profibrinolysine).*

La Streptokinase:

La *Streptokinase* est principalement formée par les *Streptocoques hémolytiques du groupe A Lancefield.* D'après certains auteurs, environ 95 % des *Streptocoques β-hémolytiques pathogènes pour l'homme sont Streptokinase-positifs. Dans le groupe* C, on trouve également des souches à activité fibrinolytique, partiellement très marquée. Chez d'*autres Streptocoques non-hémolytiques, des Pneumocoques et des Entérocoques*, on a décelé tout à fait exceptionnellement un pouvoir streptokinasique, et dans ce cas, il fallait avoir recours à des techniques de cultures spéciales.

D'après Fletcher et Johnson (35), la *Streptokinase* aurait un poids moléculaire d'environ 50 000, déterminé par ultracentrifugation. Ces auteurs ont également mis en évidence son caractère protéinique. Le point isoélectrique se situe entre pH 4,7 et 5,0. La *Streptokinase* présente son optimum d'activité à des pH de 7,3 à 7,6, mais elle est relativement stable et n'est que partiellement détruite par des variations de pH.

Standardisation de la Streptokinase:

Une unité de Streptokinase équivaut à la dose capable d'activer suffisamment le Plasminogène pour dissoudre un caillot de Fibrine standard en 10 minutes à 35°.

La Streptodornase:

Dans l'étude de l'isolement de la *Streptodornase*, nous tenons à attirer l'attention sur la possibilité, pour certaines préparations d'*ultrafiltrats streptococciques*, de lyser des exsudats purulents. On a découvert qu'il s'agit d'un ferment différent de la *Streptokinase* à qui l'on a donné le nom de *Streptodornase*, puisqu'il s'agit d'une *Désoxyribonucléase* (d'où : DORNase).

Cette enzyme est capable de dépolymériser les *Désoxyribonucléoprotéines* et de libérer l'*Acide désoxyribonucléique* qui constituent les parties essentielles des exsudats visqueux purulents.

La *Streptodornase* est très probablement un mélange de plusieurs enzymes, puisqu'elle est capable de dégrader des complexes protéiques du pus jusqu'au stade des *bases puriques et pyrimidiques.*

Standardisation de la Streptodornase:

Une unité de *Streptodornase* correspond à la dose minimum d'enzyme qui diminue d'*une poise* la viscosité d'une solution donnée d'*Acide désoxyribonucléique* d'origine thymique, et ceci en 10 minutes à 30°. Cette mesure est effectuée au *viscosimètre* d'Ostwald [Mac Carty (36)].

Toutes nos expériences ayant pour but d'étudier l'influence de la *Streptokinase sur le taux de Complément et de Prothrombine*, ont été effectuées à l'aide de la préparation *Varidase Léderlé, contenant à la fois la Streptokinase et la Streptodornase.* Ce produit, qui est utilisé le plus souvent en clinique, est conditionné sous forme lyophilisée. Chaque flacon contient 20 000 unités de Streptokinase et 5 000 unités de Streptodornase, un stabilisateur et 0,1 % de Merthiolate comme antiseptique. D'après Tillet (37), la *Varidase* contient en plus des deux enzymes essentielles de l'*Hyaluronidase et de la Ribonucléase.* La *Varidase* renferme par rapport à 1 γ d'Azote environ 100 unités de *Streptokinase*, on voit donc que la purification n'est pas parfaite et l'emploi de ce produit n'est possible que par application locale ou injection intramusculaire.

Emploi thérapeutique:

Comme nous l'avons déjà mentionné, la *Streptokinase* active la *Profibrinolysine* pour la transformer en *Fibrinolysine* qui a la propriété de fluidifier la *Fibrine.* Des caillots de sang ou des exsudats fibrineux peuvent ainsi être fluidifiés par la *Streptokinase*, à condition qu'ils contiennent suffisamment d'*Euglobulines*, substrat spécifique de cette enzyme. Dans les cas d'exsudats fibrineux pauvres en *Euglobulines*, on est obligé de recourir à un mélange de plasma humain et de *Streptokinase.*

La *Streptodornase* dégrade les déchets cellulaires du pus et liquéfie ainsi des exsudats visqueux. Étant donné que les leucocytes exercent leur action antimicrobienne surtout dans leur stade de phagocytes, c'est-à-dire à l'état mobile et amiboïde, la *Streptodornase* favorise la phagocytose par dégradation des dérivés désoxyribonucléiques accumulés dans les agglutinats de leucocytes.

L'action de ces produits enzymatiques peut se résumer ainsi : Destruction des noyaux des cellules dégénérées; élimination d'Acide désoxyribonucléique extracellulaire; fluidification d'exsudats purulents

visqueux ou fibrineux; dissolution de caillots sanguins; stimulation de la phagocytose. Ces enzymes ne semblent pas avoir d'action sur le *tissu conjonctif*, les *mucoprotéines ni sur le collagène;* par conséquent les fibres musculaires et les tendons ne sont pas attaqués.

Indications cliniques:

La présence de Fibrine et de leucocytes au niveau d'une plaie indique que l'organisme essaie de lutter contre un traumatisme qui peut être de nature microbienne, chimique ou physique. Les déchets de tissus organiques peuvent gêner le processus régénérateur, en bloquant l'arrivée de nouveaux phagocytes et des médicaments, et en isolant dans les mailles du filet de Fibrine les bactéries qui peuvent ainsi survivre. Pour activer la guérison d'une plaie, il faut par conséquent tenter d'éliminer le pus et le caillot sanguin pour faciliter l'écoulement naturel des sécrétions.

Autrefois, on était obligé de recourir à l'intervention chirurgicale pour éliminer les excès de *Fibrine et de Nucléoprotéines*, à moins qu'on ne se fiât à l'intervention d'enzymes organiques idiogènes. Dans les deux cas, des accidents pathologiques irréversibles pouvaient survenir.

Injection intramusculaire:

Des travaux qui ont été effectués dans les *Laboratoires Léderlé* ont démontré que l'emploi intramusculaire de *Varidase* avait une action très favorable sur la guérison des processus inflammatoires. On a constaté que le liquide œdémateux d'exsudats inflammatoires contenait une très forte proportion de Fibrine. Cette forte concentration en Fibrine constitue probablement un mécanisme de défense naturelle, pouvant amener une délimitation du terrain lésé.

On admettait couramment que cette délimitation des foyers infectieux ou traumatiques était très favorable. Cependant, depuis l'emploi de *préparations antibiotiques et des sulfamides*, on a constaté que ces médicaments étaient peu actifs sur les abcès, les phlegmons et les infections à foyer localisé. Ce fait est dû à l'impossibilité pour ces substances bactéricides et bactériostatiques, de traverser la barrière de Fibrine. On a donc essayé de favoriser la pénétration des médicaments par l'emploi de la *Streptokinase*. L'application locale s'étant avérée possible seulement pour les lésions superficielles, on a recouru à l'injection intramusculaire et l'on a constaté que la *Varidase* exerçait une action lytique sur la membrane fibrineuse. Le mécanisme d'action de ces enzymes n'est toujours pas entièrement élucidé, mais son emploi a donné des résultats très favorables et les accidents secondaires dus à l'injection intramusculaire de la *Varidase* sont très exceptionnels.

Ces enzymes peuvent être employées localement, sous forme de gel ou de compresses humides, dans les cas de plaies superficielles suppurantes ou de nécrose due à l'irradiation.

Emploi en aérosol:

Les deux enzymes peuvent être utilisées en aérosols dans les maladies bronchiques, avec exsudat fibrineux et crachats purulents. Pour de plus amples détails, nous renvoyons au travail de Frey. Notons seulement que cette thérapie est inactive chaque fois qu'il y a excès de *mucoprotéines*, comme dans l'asthme à crachat muqueux.

Perfusion intraveineuse:

Il paraît naturel d'y avoir recours pour la dissolution de *caillots fibrineux intravasculaires (thrombus)*. En effet, les anticoagulants actuels tels que la *Coumarine*, sont sans action sur les thrombus déjà formés. L'administration intraveineuse de *Streptokinase et de Streptodornase* n'est cependant pas sans danger et de plus amples expériences sont nécessaires pour apporter de nouvelles indications; il faudrait en premier lieu avoir recours à une préparation enzymatique hautement purifiée, difficile à réaliser comme nous l'avons vu. On pourrait ainsi éviter des effets secondaires, réactions allergiques, etc.; cependant l'effet inhibiteur sur l'activité du Complément et les facteurs de coagulation se maintient, même avec des produits très purs.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

TITRAGE DU COMPLÉMENT A 50 % D'HÉMOLYSE

Principe de la titration:

Le titrage du Complément est basé sur la propriété qu'il possède de lyser les hématies de mouton sensibilisées par une hémolysine anti-mouton. On entend par unité, la plus petite quantité de Complément exprimée en volume de sérum dilué au titre voulu, capable d'hémolyser complètement à 37° dans un temps et un volume donné par rapport à un tube témoin une quantité fixe d'hématies sensibilisées. Le tube témoin ne doit pas contenir d'hémolysines et l'hémolyse est produite par voie physico-chimique.

Pour faire le titrage on introduit dans une série de tubes à hémolyse le Complément à volume croissant, les hématies sensibilisées à dose fixe et une solution tampon en quantité suffisante pour compléter au volume voulu. La lecture des résultats se fait à l'œil nu : on cherche le dernier tube où l'hémolyse est totale. Dans le tube suivant on note encore la persistance d'un trouble dû à une partie des hématies non lysées. *L'unité est donc le volume du sérum alexique contenu dans le premier tube parfaitement limpide.* Cependant, les travaux sur l'hémolyse effectués par von Krogh (38) et Morse (39) ont montré que *l'unité 50 % qui est la quantité de Complément capable d'hémolyser 50 % des hématies sensibilisées dans les mêmes conditions de température, de temps et de dilution*, est déterminée d'une manière beaucoup plus précise que l'unité classique. En effet, la détermination de l'unité 50 % s'effectue, comme Bloch l'a expliqué, non pas à l'œil nu, mais au photomètre, ce qui élimine les facteurs d'interprétation personnelle. L'avantage de cette méthode se reconnaît à l'évolution de la courbe d'hémolyse selon un tracé en S allongé où l'hémolyse à 50 % se situe dans la partie centrale la plus abrupte.

Pour obtenir une courbe optimale, il faut par conséquent choisir la dilution de sérum la plus propice à ces conditions expérimentales.

Différents facteurs entrent en jeu dans cette réaction d'hémolyse; nous les décrivons succinctement :

Préparation et standardisation de la suspension d'hématies de mouton:

La préparation des hématies de mouton s'effectue au moyen de sang recueilli aseptiquement sur 30 cc d'une solution de *citrate de soude* à 10 % et 2 cc de *formol* à 40 % pour 1 000 cc de sang. On agite soigneusement le flacon pour éviter la coagulation. Le sang citraté ainsi préparé peut être conservé à la glacière dans des récipients clos pendant quelques semaines, mais il est préférable de le renouveler toutes les semaines. Avant de procéder à la standardisation des hématies, il faut les laver pour éliminer toute trace *de plasma et de citrate de sodium* qui pourraient bloquer l'hémolyse.

Le sang, bien agité, est centrifugé pendant 10 minutes à 2 000 t mn, le liquide surnageant est décanté et remplacé par un même volume de soluté physiologique. On mélange soigneusement et on centrifuge de nouveau. Puis on décante et on procède encore à deux lavages successifs. Si le troisième liquide de centrifugation reste coloré en rouge ou en rose, les hématies sont inaptes à la réaction.

Les hématies lavées doivent être utilisées le jour même, puisqu'une fois privées des protéines plasmatiques naturelles, elles sont rapidement détruites. Si l'on veut standardiser une suspension d'hématies, on y ajoute 0,1 % d'albumine de bœuf.

La standardisation doit être effectuée en se référant à l'unité 50 % d'hémolyse. On prépare la suspension globulaire en diluant dans des proportions convenables le culot d'hématies précédemment préparé dans du soluté physiologique. Cependant, la teneur en hématies de ce culot n'est pas constante, aussi est-il nécessaire de contrôler le titre de cette suspension et de l'ajuster ensuite au titre standard. La méthode de choix à ce sujet est la méthode photocolorimétrique qui mesure la teneur en hémoglobine de la suspension d'hématies. Pour cela on libère l'hémoglobine contenue dans les globules rouges, en ajoutant dans certaines proportions de l'eau distillée qui lyse les hématies de la suspension et on mesure la densité optique de la solution rouge ainsi obtenue au moyen du photocolorimètre muni d'un filtre produisant une lumière monochromatique verte. En effet, l'hémoglobine se trouve en solution sous forme d'oxyhémoglobine, dont l'absorption est maximale quand la longueur d'ondes de la lumière utilisée est de 5 410 Å à 5 760 Å.

Pour toutes nos mesures, nous avons utilisé le *photocolorimètre américain Lumetron.* Les dosages se faisaient en lumière monochromatique au moyen d'un filtre donnant une longueur d'ondes de 5 500 Å. Les variations de coloration enregistrées par la cellule photoélectrique se lisent directement par le déplacement du spot d'un galvanomètre

muni d'une échelle graduée. La suspension standard d'hématies de mouton est définie de la manière suivante : 0,5 cc de la suspension globulaire + 5,5 cc d'eau distillée donnent une solution d'oxyhémoglobine, dont la densité optique est de 50° Lumetron. Une telle suspension contient environ 800×10^6 hématies par centimètre cube. La standardisation photométrique de la suspension globulaire se fera de la manière suivante : On prépare une suspension en diluant quatre parties du culot globulaire avec 96 parties de soluté physiologique. Dans un premier tube à essai, calibré pour *le Lumetron*, on introduit 6 cc d'eau distillée et dans un second on lyse 0,5 cc de la suspension globulaire précédente par 5,5 cc d'eau distillée. Etant donné que *le Lumetron mesure la transmission* de la solution à examiner, *et non pas l'adsorption*, on met le spot du galvanomètre sur le point 100 à l'aide du premier tube, puis on place le second tube dans l'appareil et on note la déviation du spot. La densité optique et la transmission étant exprimées par la relation

$$D = 2 - \log T \text{ ou encore } \frac{\log 100}{T}$$

T étant la transmission pour cent, la deuxième formule n'est autre que l'expression analytique de la relation logarithmique inversée mentionnée tout d'abord.

Pour plus de simplicité, nous donnons dans le tableau suivant la correspondance entre *la transmission et la densité optique* de la solution étudiée. Soit de la densité optique de la solution d'oxyhémoglobine, il suffit d'ajouter (d-50) cc de soluté physiologique à 50 cc de la suspension à 4 % d'hématies pour obtenir la suspension standard.

TABLEAU N° 1

Dizaines	Degrés Lumetron — Unités									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0	20,00	16,99	15,23	13,98	13,01	12,22	11,55	10,57	10,46
1	10,00	9,59	9,21	8,86	8,54	8,24	7,96	7,70	7,44	7,21
2	6,99	6,78	6,57	6,38	6,20	6,02	5,85	5,69	5,53	5,37
3	5,23	5,09	4,95	4,81	4,68	4,56	4,44	4,32	4,20	4,09
4	3,98	3,87	3,77	3,66	3,57	3,47	3,38	3,28	3,19	3,10
5	3,01	2,93	2,84	2,76	2,68	2,60	2,52	2,44	2,38	2,30
6	2,22	2,15	2,08	2,01	1,94	1,87	1,80	1,74	1,67	1,61
7	1,55	1,49	1,43	1,36	1,31	1,25	1,19	1,13	1,08	1,02
8	0,97	0,92	0,86	0,81	0,76	0,70	0,65	0,60	0,50	0,50
9	0,46	0,41	0,36	0,32	0,27	0,22	0,17	0,13	0,09	0,04

Titrage du Complément:

Pour effectuer ce titrage, il faut les réactifs suivants :

— Solution de chlorure de sodium chimiquement pur à 9 $^{0}/_{00}$.

— *Solution tampon :*

Chlorure de sodium	83,80 g
Bicarbonate de soude	2,52 g
Véronal sodique	3,00 g
Véronal base	4,60 g
Chlorure de magnésium (6 H^2O)	1,00 g
Chlorure de calcium (2 H^2O, siccum) .	0,20 g

On dissout le Véronal dans 500 cc d'eau chaude puis on ajoute les autres composants. On refroidit et on complète à 2 000 cc par l'eau distillée. Au moment de l'emploi on dilue une partie avec 4 parties d'eau distillée. La solution-mère doit être conservée à la glacière, son pH doit être de 7,3 à 7,4. La solution diluée prête à l'emploi doit être isotonique.

— *Complément :*

Nous avons employé le Complément lyophilisé de *l'Institut Pasteur* préparé au moyen d'un mélange de plusieurs sérums de cobayes. Une ampoule lyophilisée est additionnée de 0,5 cc du solvant de *l'Institut Pasteur* et la solution ainsi obtenue correspond au sérum pur de cobaye.

— *Sérum humain :*

Il provient de sang prélevé par ponction veineuse au *Centre de Transfusion de Strasbourg*. Congelé au réfrigérateur, il se conserve parfaitement pendant 15 jours.

— *Hématies de mouton sensibilisées :*

Les hématies de mouton sont sensibilisées au moyen de sérum anti-mouton qui peut être préparé selon la méthode indiquée par Sartory et Meyer (40). On peut également recourir au sérum hémolytique de *l'Institut Pasteur*, hautement actif.

On mélange un volume de suspension d'hématies standardisées avec un volume de sérum hémolytique dilué selon les besoins au moyen de soluté physiologique, puis un volume d'une solution de Sulfate de magnésium à 1 % dans le soluté physiologique.

Mode opératoire:

On prépare onze tubes à hémolyse dans lesquels on introduit successivement les réactifs de la manière suivante :

— Le Complément ajusté au titre voulu, en doses croissantes.

— la solution tampon pour ramener le volume de chaque tube à 1,5 cc.

— La suspension standardisée d'hématies sensibilisées : 1,5 cc.

Le 11e tube, servant de témoin, ne contient pas de Complément. Le tableau ci-dessous donne la composition des réactifs dans chaque tube.

TABLEAU N° 2

Réactifs :	Tubes N°										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Complément dilué .	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	—
Solution tampon ..	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	1,00	1,50
Suspension d'hématies.....	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50

On mélange soigneusement et on dispose à 37° pendant 45 minutes. Afin d'obtenir un titrage correct, il faut agiter toutes les 10 minutes pour remettre les hématies en suspension. Après ce temps, on procède à la lecture et si les réactifs sont correctement préparés, on constate que l'hémolyse est optimale dans le 10e tube et diminue progressivement vers la gauche. Pour déterminer le pourcentage d'hémolyse, on centrifuge à 2 000 t/mn pendant 10 minutes, puis on mesure la transmission optique de la solution limpide surnageante, qui contient de *l'oxyhémoglobine* en rapport direct avec l'intensité de l'hémolyse. On procède à la lecture au *Lumetron* au moyen d'un filtre vert de 5 500 Å et on transpose les degrés de transmission en pourcentage d'hémolyse sur la courbe-étalon.

Établissement de la courbe-étalon:

Nous avons hémolysé 0,5 cc de suspension d'hématies de mouton standard au moyen de 5,5 cc d'eau distillée. Cette solution correspond à une hémolyse de 100 % et en la diluant progressivement au moyen d'eau distillée, on obtient une gamme de 10 % à 100 % d'hémolyse; ces différentes dilutions sont mesurées au *Lumetron* et nous exprimons les résultats obtenus dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 3

Tube N°	Pourcentage d'hémolyse	Degrés de transmission
1	0	100
2	10	88
3	20	77
4	30	68
5	40	60
6	50	53
7	â0	47,5
8	70	43
9	80	39
10	90	36
11	100	31,65

On voit que nous avons travaillé ici avec une dilution d'hématies de mouton préparée avec 0,5 cc de la suspension standardisée lysée dans 5,5 cc d'eau distillée. Au cours du dosage du Complément par contre, nous avons utilisé 0,5 cc de la suspension d'hématies lysées dans 2,5 cc d'eau distillée. Nous avons donc été obligé de compléter la courbe-étalon en lysant 1 cc de suspension globulaire standardisée dans 5 cc d'eau distillée, ce qui correspond à 200 % d'hémolyse.

TABLEAU N° 4

Tube N°	Pourcentage d'hémolyse	Degrés de transmission
12	110	28,65
13	120	26
14	130	23,65
15	140	21,6
16	150	19,8
17	160	18,4
18	170	17,4
19	180	16,6
20	190	16,1
21	200	16

Nous donnons ci-dessous la courbe d'étalonnage en inscrivant en ordonnée les degrés Lumetron et en abscisse le pourcentage d'hémolyse.

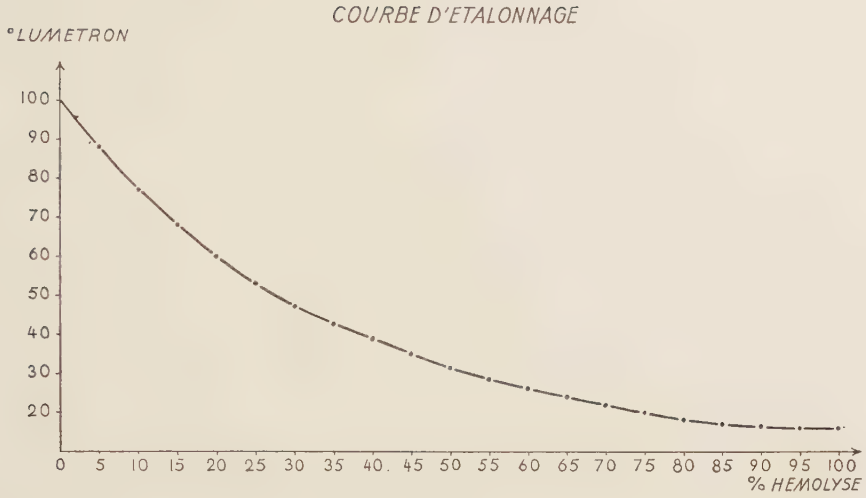

Fig. N° 1

Pourcentage d'hémolyse par rapport à la dose de sérum hémolytique.

Notons que les degrés Lumetron correspondent à la dose de sérum sensibilisé introduite. L'unité 50 % d'hémolyse correspond, d'après notre expérience, à 31,65 degrés de transmission. On peut ainsi calculer le nombre d'unités contenu dans 1 cc de sérum frais non dilué, par rapport à la dilution mise en essai.

CHAPITRE V

DOSAGE DU COMPLÉMENT DANS DES SÉRUMS D'HOMME ET DE COBAYE

Nous avons tout d'abord jugé nécessaire de doser le taux de Complément de quelques sérums humains non pathologiques et de différents lots de sérum de cobaye au moyen de notre méthode à 50 % d'hémolyse.

Les *sérums humains*, provenant du *Centre de Transfusion de Strasbourg*, sont à considérer comme des sérums normaux. Nous avons procédé au dosage au moyen d'une dilution de sérum à 1/30 et d'une suspension d'hématies de mouton sensibilisées. Nous donnons ci-dessous les résultats obtenus pour quelques sérums.

TABLEAU N° 5

Tube No	Dose de sérum en cc	Série 1		Série 2		Série 3	
		Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.
1	0,05	100	0	100	0	100	0
2	0,10	94,5	2,5	96	2,0	100	0
3	0,15	88	5,0	90	4,5	100	0
4	0,20	69	14,0	78	10,0	100	0
5	0,25	49	28,0	60	20,0	100	0
6	0,30	37	42,0	50	27,5	100	0
7	0,35	28,5	54,5	41	37,5	100	0
8	0,40	25,5	62,0	33	48,0	100	0
9	0,45	22,5	68,0	29	53,5	100	0
10	0,50	21	72,0	27	58,0	100	0
11 T.	—	100	0	100	0	100	0

Taux de Complément à 50 % d'hémolyse :

Série 1 : 71 U.

Série 2 : 80 U.

Série 3 : 0 U.

Interprétation:

Les séries nos 1 et 2 comprennent des sérums *non chauffés*, pour déterminer le taux de Complément intégral, tandis que la série n° 3 a été effectuée avec les mêmes sérums, mais inactivés par un chauffage à 56° pendant 30 minutes. Ces sérums inactivés sont alors employés purs.

Cette façon de procéder était nécessaire puisque nous employons par la suite le sérum inactivé comme source de Profibrinolysine; nous avons ainsi la preuve que ces sérums inactivés n'ont plus aucune activité complémentaire, ce qui ne veut pas dire que tous les composants du Complément aient été détruits.

En ce qui concerne les *sérums de cobaye*, nous avons employé le Complément lyophilisé de *l'Institut Pasteur*. Ce sérum recomposé à l'aide du solvant a été utilisé à la dilution de 1/100 dans le soluté physiologique.

Les titrages ont été effectués à l'aide de sérum de cobaye toujours identique et de différentes suspensions d'hématies de mouton fraîchement préparées. Nous donnons ci-dessous trois exemples de ces titrages.

TABLEAU N° 6

Tube N°	Dose de sérum en cc	Série 1		Série 2		Série 3	
		Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.
1	0,05	100 0	0	99	0,5	93	3,0
2	0,10	95,5	2,0	92,5	3,0	49,5	28,0
3	0,15	87,5	5,5	83,5	7,0	34,5	46,0
4	0,20	68,5	14,5	61,5	19,0	31	51,5
5	0,25	49,5	18,5	41	37,5	27,5	57,0
6	0,30	37	42,0	30	52,5	25	62,0
7	0,35	28,5	54,5	22	70,0	22,5	67,0
8	0,40	25	62,0	20,5	73,0	20	74,5
9	0,45	22,5	68,0	19	77,5	18,5	80,0
10	0,50	21	72,0	18	80,0	17	85,0
11	0,0	100	0	100	0	100	0

Taux de Complément à 50 % d'hémolyse :

Série 1 : 295 U.
Série 2 : 339 U.
Série 3 : 518 U.

En considérant ces résultats, on constate que le pourcentage d'hémolyse à 50 % varie en rapport avec la suspension globulaire qui se modifie d'une préparation à l'autre. Ce fait nous a incité à effectuer, parallèlement à chaque essai, une série témoin, afin d'amener tous les résultats à la même référence.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE LA STREPTOKINASE SUR LE TAUX DE COMPLÉMENT DU SÉRUM

Pour réaliser ces recherches, nous avons fait agir des doses variables de *Streptokinase* sur des sérums humains et ceci à 37° et durant des temps plus ou moins longs, puis nous avons déterminé le *taux alexique*. Nous avons ainsi été obligé d'employer une dilution du sérum en rapport avec son titre alexique initial.

La première série d'essais comportait un mélange de 0,5 cc de sérum humain et de doses croissantes de Streptokinase : 500 — 1 000 — 1 500 — 2 000 unités. Le mélange est disposé pendant une heure à 8°. Les dilutions de *Streptokinase* sont préparées à partir d'une ampoule de *Varidase* à 20 000 unités de Streptokinase, diluées dans 2 cc de soluté physiologique, de sorte que 0,05 cc de cette dilution contiennent exactement 500 unités.

Le mélange de 0,5 cc de sérum humain et des différentes doses de Streptokinase est ajusté à 2 cc au moyen de soluté physiologique, puis disposé pendant une heure à 37°. Après ce temps, on interrompt la réaction et on ramène le volume total à 15 cc à l'aide de soluté physiologique, de sorte que la dilution de sérum est de 1/30. Dans le tableau suivant, nous donnons les résultats de ces expériences.

TABLEAU N° 7

Tube N°	Dose sérum cc	Série 1		Série 2		Série 3		Série 4		Série 5	
		Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.
1	0,05	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
2	0,10	97	1,5	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
3	0,15	90	4,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
4	0,20	80	8,5	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
5	0,25	68	15,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
6	0,30	52	26,0	99	0,5	100	0,0	100	0,0	100	0,0
7	0,35	36	43,0	99	0,5	99	0,5	99	0,5	100	0,0
8	0,40	31	50,5	98	1,0	98	1,0	99	0,5	99	0,5
9	0,45	28	55,0	97	1,5	98	1,0	98	1,0	99	0,5
10	0,50	26	60,0	95	2,0	96	2,0	97	1,5	98	1,0
11 T	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0

Taux de Complément à 50 % d'hémolyse :

Série 1 — sans Streptokinase ..... 77 U.
Série 2 — avec 500 U. Streptokinase ..... 12 U.
Série 3 — avec 1 000 U. Streptokinase ..... 10 U.
Série 4 — avec 1 500 U. Streptokinase ..... 8 U.
Série 5 — avec 2 000 U. Streptokinase ..... 7 U.

Interprétation:

La dilution de 1/30 du sérum est trop poussée pour les séries additionnées de *Streptokinase* et l'activité alexique ne peut plus être saisie, ce qui prouve *une action inhibitrice de la Streptokinase sur le Complément.*

C'est pour cette raison que nous avons effectué une seconde série d'expériences en employant la dilution-mère du sérum telle que, de sorte que la dilution effective dans les séries expérimentales était de 1/4, mais nous avons laissé agir *la Streptokinase* pendant 2 heures sur le Complément.

Nous donnons les résultats de ces essais dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 8

Tube N°	Dose Sérum cc	Série 6		Série 7		Série 8		Série 9		Série 10	
		Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.	Degré Lum.	% hémol.
1	0,50	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0
2	0,10	96,5	1,5	97	1,5	99	0,5	99	0,5	99	0,5
3	0,15	88	5,0	89	4,5	93	3,0	92	3,0	93	3,0
4	0,20	72	12,5	74	11,5	86	6,0	88	5,0	87	5,5
5	0,25	59	20,5	61	19,5	78	9,5	78	9,5	80	9,0
6	0,30	45	32,5	48	29,5	69	14,5	70	14,0	72	13,0
7	0,35	33	47,5	37	44,0	60	20,0	62	19,0	64	17,5
8	0,40	30	52,0	32	49,0	50	27,5	52	25,0	54	24,0
9	0,45	27	57,4	30	52,0	39	40,0	40	38,0	41	37,0
10	0,50	25,5	60,0	28	55,0	33	47,5	34	46,0	34	46,0
11 T	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0

Taux de Complément à 50 % d'hémolyse :

Série 6 — sans Streptokinase ..... 82 U.
Série 7 — avec 500 U. Streptokinase ..... 9 U.
Série 8 — avec 1 000 U. Streptokinase .... 6,5 U.
Série 9 — avec 1 500 U. Streptokinase..... 6 U.
Série 10 — avec 2 000 U. Streptokinase .... 6 U.

Interprétation :

Dans ces nouvelles conditions expérimentales, on constate que la *Streptokinase inhibe en grande partie le Complément.*

Dans ces deux essais, nous avons intentionnellement noté toutes nos mesures colorimétriques, pour montrer l'*importance de la dilution du sérum à employer*, évitant ainsi, comme on pouvait le croire dans les premiers essais, la destruction totale du Complément. Par la suite, nous avons jugé inutile de mentionner tous ces détails, et nous exprimons l'activité hémolytique du Complément simplement en Unités d'hémolyse à 50 %.

En présence des résultats obtenus pour ces deux essais, où la durée d'action de *la Streptokinase* a été augmentée d'une à deux heures, nous avons porté cette durée à trois heures avec les résultats suivants :

Série 11 — sans Streptokinase	90	U.
Série 12 — avec 500 U. Streptokinase	8	U.
Série 13 — avec 1 000 U. Streptokinase	5	U.
Série 14 — avec 1 500 U. Streptokinase	4,5	U.
Série 15 — avec 2 000 U. Streptokinase	5	U.

Ces résultats nous prouvent que la prolongation de la durée d'action au-delà de deux heures n'apporte pas de modification sensible du pouvoir inhibiteur *de la Streptokinase sur le Complément* du sérum humain.

Nous pouvons donc conclure que l'inactivation optimale du Complément humain par *la Streptokinase* est obtenue en faisant agir 1 000 U. de Streptokinase sur 0,5 cc de sérum pendant 2 heures.

Influence de la Streptokinase sur le taux de Complément du sérum de cobaye :

Nous avons repris ces expériences au moyen de sérum de cobaye notoirement très riche en Complément. D'après la littérature spécialisée, le sérum de cobaye est dépourvu de *proactivateur catalysable par la Streptokinase* et nécessaire pour la transformation de la Profibrinolysine en Fibrinolysine.

Si la *Streptokinase* intervient effectivement dans la formation de la *Fibrinolysine*, comme nous avons pu le démontrer pour le sérum humain et s'il y a un rapport entre Fibrinolysine et Complément, l'inactivation de celui-ci ne devrait pas se manifester, ou alors très faiblement. Nous avons contrôlé ces faits en employant 0,5 cc de sérum de cobaye additionné de 500 — 1 000 — 1 500 et 2 000 U. de Streptokinase; le tout est alors ajusté à 2 cc au moyen de soluté physiologique, puis porté pendant 2 heures à 37° pour l'inactiver éventuellement.

Après ce temps, tous les mélanges sont ramenés à 50 cc pour obtenir une dilution de sérum de 1/100. Ci-dessous les résultats de ces expériences :

Série 16 — sans Streptokinase ..... 380 U.
Série 17 — avec 500 U. de Streptokinase ... 332 U.
Série 18 — avec 1 000 U. de Streptokinase .... 329 U.
Série 19 — avec 1 500 U. de Streptokinase .... 330 U.
Série 20 — avec 2 000 U. de Streptokinase .... 325 U.

En considérant ces résultats, on peut admettre que l'effet d'inactivation du Complément fait défaut ou est très faible, *ce qui peut être imputé au manque du proactivateur de la Profibrinolysine.*

Pour cette raison, *nous avons doublé la durée de réaction* dans une nouvelle série d'essais. Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :

Série 21 — sans Streptokinase ..... 435 U.
Série 22 — avec 500 U. de Streptokinase .... 371 U.
Série 23 — avec 1 000 U. de Streptokinase .... 368 U.
Série 24 — avec 1 500 U. de Streptokinase .... 368 U.
Série 25 — avec 2 000 U. de Streptokinase .... 370 U.

Ces résultats ne diffèrent guère de ceux de l'essai précédent. Si nous voulons rendre l'absence *d'un proactivateur de la Profibrinolysine* responsable de ces résultats négatifs, *il faut ajouter au sérum de cobaye de la Profibrinolysine ou son proactivateur.* Comme source de Profibrinolysine ou de son proactivateur on connaît surtout le sérum humain, dont le pouvoir hémolytique a été détruit préalablement par chauffage.

Influence de la Streptokinase sur un mélange de sérum d'homme et de cobaye:

On mélange 0,5 cc de sérum humain inactivé avec 0,5 cc de sérum de cobaye, puis on ajoute 500 — 1 000 — 1 500 — 2 000 unités de Streptokinase. Tous les tubes sont ensuite amenés à 2 cc au moyen de soluté physiologique et placés pendant 2 heures à 8°. On retire de chaque tube 1 cc de façon à obtenir deux séries identiques, dont la première est diluée à 50 cc (dilution du sérum à 1/100) et la seconde à 5 cc (dilution du sérum à 1/10). Ci-dessous les résultats de cette expérience :

Série 26 — sans Streptokinase (dilution du sérum à 1/100) 480 unités,
Série 27 — avec 500 U. de Streptokinase (sérum à 1/10) 72 unités,
Série 28 — avec 1 000 U. de Streptokinase (sérum à 1/10) 63 unités,
Série 29 — avec 1 500 U. de Streptokinase (sérum à 1/10) 60 unités,
Série 30 — avec 2 000 U. de Streptokinase (sérum à 1/10) 63 unités.

Ces résultats montrent *une action inhibitrice de la Streptokinase* qui n'est cependant pas totale et qui est susceptible d'être encore augmentée. Il faut noter d'autre part que dans les séries à dose *de Strepto-*

kinase élevée l'inactivation est relativement peu augmentée. Ceci pourrait être imputable à *un taux de Profibrinolysine activable* encore trop faible.

Dans une autre série d'essais, où nous avons mélangé 2 cc de *sérum humain inactivé* avec 0,5 cc de sérum de cobaye, les résultats n'ont guère été modifiés, puisque nous avons obtenu les valeurs suivantes :

Série 31 — sans Streptokinase ..... 423 unités,
Série 32 — avec 500 U. de Streptokinase 58 unités,
Série 33 — avec 1 000 U. de Streptokinase 52 unités,
Série 34 — avec 1 500 U. de Streptokinase 52 unités,
Série 35 — avec 2 000 U. de Streptokinase 50 unités.

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'employer *une autre source de Profibrinolysine : le sérum humain frais*, qui contient donc encore *le Complément actif*. Nous avons admis, en opposition avec différentes mentions de la littérature spécialisée que *l'inactivation alexique* par le chauffage à 56° pendant 30 minutes occasionne également *une destruction partielle du proactivateur nécessaire à la réaction Profibrinolysine-Fibrinolysine.*

Nous avons par conséquent effectué quatre nouvelles séries d'essais en mélangeant respectivement 0,5 — 1,0 — 1,5 et 2,0 cc de *sérum humain frais* à chaque fois 0,5 cc de sérum de cobaye. Nous donnons les résultats obtenus dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 9

Série :	Taux de Complément à 50 % d'hémolyse après addition de sérum humain :			
	0,5 cc	1,0 cc	1,5 cc	2,0 cc
sans Streptokinase	520	532	555	578
500 U. Streptokinase	74	50	31	29
1 000 U. Streptokinase	42	32	19	20
1 500 U. Streptokinase	40	15	9	9
2 000 U. Streptokinase	40	12	8	7

On voit ainsi qu'il faut une certaine proportion de sérum humain pour apporter une dose suffisante de Profibrinolysine dans la réaction avec le sérum de cobaye; de même il existe un optimum de Streptokinase qu'il est sans intérêt de dépasser.

Ces recherches nous ont permis d'élucider les conditions d'une inactivation optimale.

En connaissance de ces faits, nous avons ensuite voulu examiner l'influence de la température sur le processus d'inactivation.

Influence de la température sur l'activité de la Streptokinase:

Dans ces recherches, nous avons employé 0,5 cc de sérum de cobaye, 2 cc de sérum humain et 2 000 unités de Streptokinase, de sorte que nous étions assuré d'avoir un excès de Profibrinolysine et de Streptokinase; mais l'addition de 0,5 cc de sérum humain amène déjà une destruction partielle du Complément, prouvant l'importance de la Profibrinolysine dans cette réaction.

Nous avons mis en œuvre des températures de 0°, 20° et 37°. Pour les températures inférieures à 37°, nous avons pensé qu'il était nécessaire de prolonger la durée d'action et avons contrôlé l'action de la Streptokinase après 2 et 12 heures. Pour les réactions effectuées à 37°, les dilutions de sérum étaient de 1/10 et pour les deux autres températures elles étaient de 1/100. Il faut remarquer que nous avons effectué pour chaque expérience une série témoin, dans laquelle la même dose de Streptokinase était ajoutée au moment de la réaction, ceci pour la raison suivante : L'activité hémolytique du Complément est réalisée avec des sérums dilués disposés pendant 45 minutes à 37°; ce temps est relativement long, il pourrait donc se produire une inactivation notable de l'activité hémolytique de la Streptokinase, ce qui a été prouvé effectivement au cours de nos essais, dont nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 10

Température	Taux de Complément à 50 % d'hémolyse après :			
	2 heures		12 heures	
	Réaction	Témoin	Réaction	Témoin
37°	9	370	0	264
20°	380	382	197	311
0°	385	385	350	350

L'interprétation de ces résultats ne peut se faire qu'en comparaison avec les tubes témoins; on constate ainsi qu'à 0° il n'y a aucune inactivation; le même phénomène se produit à 20° pendant 2 heures, tandis qu'après 12 heures, la diminution de l'activité hémolytique est nette. A 37° l'inactivation maximale est déjà atteinte après 2 heures de réaction.

Dans les 10 heures qui suivent, le petit résidu de Complément disparaît mais ce fait n'est pas imputable à l'effet de *la Streptokinase :* il est dû à *une inactivation du Complément par le séjour du sérum pendant* 12 *heures à* 37°, qui ressort également de la diminution de l'activité alexique du témoin.

Nous avons complété ces essais en disposant notre substrat réactionnel pendant 12 heures à 0°, puis pendant 2 heures à 37°. L'intensité

d'inactivation était identique à celle d'une série n'ayant pas séjourné à 0°. On peut en conclure que le Complément n'est pas inhibé à 0° par la réaction catalysante de la Streptokinase sur la Profibrinolysine; un substrat réactionnel ainsi traité reste intégralement actif. D'autre part, nous pouvons interrompre à tout moment l'action inhibitrice de la Streptokinase en disposant le substrat réactionnel à la glacière.

Influence de la concentration en ions Calcium sur l'action inhibitrice de la Streptokinase:

On sait que *les ions Calcium* jouent un rôle important dans le processus d'hémolyse. Ainsi, leur absence le supprime totalement.

Etant donné que le Complément est inactivé au cours de l'hémolyse on pourrait supposer que des *ions calciques* sont également nécessaires dans l'*action de la Streptokinase sur le Complément.* Ce fait peut être contrôlé en augmentant la concentration *en ions Calcium*, ce qui pourrait provoquer une inactivation plus importante. Pour ces raisons, nous avons employé 0,5 cc de sérum de cobaye, 2 cc de sérum humain et 2 000 unités de Streptokinase et nous avons ajouté à ce mélange 0,5 — 1,5 et 3,0 cc d'une solution à 1 % de chlorure de calcium. Tous les tubes ont été ramenés à 5 cc au moyen de soluté physiologique. Après un séjour de 2 heures à 37°, nous avons mesuré le taux alexique dans une dilution du sérum à 1/10, avec les résultats suivants :

TABLEAU N° 11

Série N°	Addition de $CaCl_2$ 1 % cc	Unités de Complément à 50 % d'hémolyse
1	0,0	8
2	0,5	9
3	1,5	8
4	3,0	8

En comparant ces résultats, on constate que l'addition de *Chlorure de calcium* n'a aucun effet sur le processus d'inactivation. On peut en conclure que le taux calcique normal du sérum suffit pour obtenir une inactivation optimale par la Streptokinase.

Nous n'avons pas pu contrôler l'influence d'une hypocalcémie sur le processus d'inactivation du Complément, puisque l'hémolyse est déjà freinée ou supprimée par le manque de Calcium, de sorte que nous ne savons pas interpréter le rôle de l'un ou de l'autre facteur : Calcium ou Streptokinase?

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE LA STREPTOKINASE SUR LES DIVERS COMPOSANTS DU COMPLÉMENT

Ces essais devaient nous permettre de mettre en évidence le mécanisme d'action de *la Streptokinase sur le Complément même.* Nous avons ainsi essayé de déterminer quel chaînon était touché.

A cet effet, nous avons préparé les quatre réactifs alexiques R_1, R_2, R_3 et R_4 (respectivement sans C'_1, C'_2, C'_3 et C'_4). Ces réactifs servaient de témoin et étaient simultanément examinés quant à leur activité complémentaire. Chaque réactif était ensuite additionné *d'un sérum inactivé par la Streptokinase* et nous avons contrôlé si cette adjonction supplémentaire de sérum amenait une augmentation de l'activité alexique. Nous espérions ainsi voir si *la Streptokinase* agit sur l'un ou l'autre des composants alexiques, ou si les quatre chaînons sont inhibés.

Nous avions constaté antérieurement qu'un mélange de 0,5 cc de sérum de cobaye + 2,0 cc de sérum humain + 2 000 unités de Streptokinase perdait presque complètement son activité hémolytique par un séjour de 2 heures à 37°. Si l'on prolonge ce temps jusqu'à 6 heures, l'activité alexique est complètement détruite. Le rôle de cette longue exposition à 37° ne nous a pas échappé.

Préparation des différents réactifs alexiques:

Nous avons préparé les réactifs alexiques en partant de sérum de cobaye lyophilisé.

On prépare R_1 et R_2 en ajoutant goutte à goutte 1 cc de sérum à 19 cc d'une solution de Phosphate monopotassique ($POKH^2$ — poids mol. 136), à 0,02 mol. (= 2,73 g/l 000) qui ramène le pH à 4,5. On dispose pendant 5 heures à 0°, on centrifuge dans un centrifugeur refroidi à 0° à la vitesse de 1 200 t/mn pendant 20 minutes. On décante soigneusement; le liquide décanté correspond à R_1. Ce réactif est rendu isotonique par addition de 1,9 cc d'une solution de Chlorure de sodium à 10 %, puis on ramène à pH = 7,2 par addition d'une solution de Bicarbonate de sodium 0,1 N.

Le résidu constitue le réactif complémentaire R_2. On le lave une fois par centrifugation pendant 20 minutes avec la solution précédente

au Phosphate monopotassique à 0,02 mol. On porte à 5 cc par addition de solution tampon au Véronal, dont nous avons donné la composition antérieurement.

Le réactif alexique R_3 est préparé à partir du sérum inactivé par le *Liquoïde Roche (Anéthol-disulfonate de sodium)*. A 0,5 cc de sérum on ajoute 0,12 cc d'une solution de Liquoïde à 1 % dans le soluté physiologique. Le mélange est porté à 37° pendant 15 minutes sous agitation, puis refroidi et dilué à 10 cc avec le tampon au Véronal.

Le réactif R_4 est préparé en ajoutant à 1 cc de sérum 0,25 cc d'une solution de NH^4OH-0,15 N. On laisse pendant 90 minutes au bain-marie à 30° et on neutralise avec 0,25 cc d'Acide chlorhydrique 0,15 N. On y ajoute la solution tampon au Véronal en quantité suffisante pour compléter à 3 cc.

Mode opératoire:

PREMIER ESSAI :

Nous mesurons l'activité hémolytique du réactif R_1 seul, puis additionné d'une même quantité de R_1 inactivé par la Streptokinase. La dilution finale du sérum est de 1/100 :

0,5 cc de réactif R_1 ..... = 140 U. 50 %
0,5 cc de R_1 + 0,5 cc sérum inactivé ..... = 137 U. 50 %

Il ressort de cette expérience que l'addition du sérum inactivé par la Streptokinase n'amène aucune augmentation de l'activité hémolytique de R_1. Si, dans ce sérum, le chaînon C'_1 n'avait pas complètement été inhibé par *la Streptokinase*, on aurait dû constater une activité hémolytique augmentée, puisque tous les quatre composants auraient été présents.

Dans les trois essais suivants, nous avons procédé de la même façon, mais en ayant recours aux réactifs alexiques R_2, R_3 et R_4. L'activité hémolytique ainsi constatée est indiquée ci-dessous :

DEUXIÈME ESSAI : 0,5 cc de réactif R_2 ..... 0 unité 50 %
0,5 cc de R_2 + 0,5 cc sérum inactivé 0 unité 50 %

TROISIÈME ESSAI : 0,5 cc de réactif R_3 ..... 84 unités 50 %
0,5 cc de R_3 + 0,5 cc sérum inactivé 123 unités 50 %

QUATRIÈME ESSAI : 0,5 cc de réactif R_4 ..... 0 unité 50 %
0,5 cc de R_4 + 0,5 cc sérum inactivé 0 unité 50 %

Interprétation:

Ces essais nous prouvent que parmi les quatre réactifs alexiques, deux seulement, R_1 et R_3, ont gardé un pouvoir hémolytique, mais le chaînon C'_1 est inhibé par le système Streptokinase-Profibrinolysine.

Les témoins nous montrent que le chaînon C'_3, qui joue notoirement le rôle le plus important dans les phénomènes immunologiques, n'est pas complètement détruit. Cependant, dans la troisième série d'essais, nous obtenons le résultat le plus intéressant, parce que, même si dans le réactif R_3 seul tout le C'_3 n'a pas été détruit, nous constatons indubitablement que l'addition de sérum inactivé par la *Streptokinase* occasionne une forte augmentation du pouvoir hémolytique. Ce qui prouve un apport de C'_3 par le sérum inactivé; ce chaînon est donc résistant à la *Streptokinase*, alors que les trois autres chaînons sont détruits.

Nous avons ensuite contrôlé l'action directe de la *Streptokinase* sur les deux réactifs alexiques qui avaient conservé une certaine activité hémolytique.

Ces recherches ont présenté un inconvénient : en effet, nous ne savons pas si les réactifs alexiques contiennent encore suffisamment de *Profibrinolysine* activable. C'est pour cette raison que nous avons effectué les essais suivants à l'aide de *Fibrinolysine.*

Nous faisons agir à 37° pendant une heure 2 mg de Fibrinolysine sur 0,5 cc de réactif R_1 et R_3. L'activité du Complément est mesurée à l'aide d'une dilution de sérum à 1/100.

CINQUIÈME ESSAI :	0,5 cc de réactif R_1	162 unités 50 %
	0,5 cc de R_1 + 2 mg de Fibrinolysine	159 unités 50 %
SIXIÈME ESSAI :	0,5 cc de réactif R_3	97 unités 50 %
	0,5 cc de R_3 + 2 mg de Fibrinolysine	0 unité 50 %

Interprétation:

Contrairement à notre supposition, nous constatons que *la Fibrinolysine n'est pas capable d'inactiver le réactif* R_1, ce qui prouve que le chaînon C'_1, joue un rôle important dans le phénomène d'inactivation par la Streptokinase.

Nous voyons ainsi que l'inactivation du Complément par la Streptokinase s'effectue suivant un processus *différent* de celui de la réaction d'hémolyse immunologique.

Nous pouvons résumer nos constatations de la façon suivante: *Le Complément peut être en grande partie détruit par la Streptokinase ;* le chaînon C'_3 est le plus résistant contre celle-ci; l'inactivation n'est possible que si C'_1 est présent. Le processus d'inactivation détaillé doit s'effectuer dans l'ordre suivant :

Streptokinase — proactivateur — activateur — Profibrinolysine — Fibrinolysine — C'_1 — C'_4 — C'_2 — C'_3.

Ces résultats ont été atteints aux cours de nombreuses expériences, dont nous n'avons rapporté ici que les plus importantes.

CHAPITRE VIII

INACTIVATION DE LA PROTHROMBINE PAR LA STREPTOKINASE ET L'HYALURONIDASE

Dans le chapitre deuxième, nous avons mentionné qu'il existe une telle analogie entre *la Prothrombine et le chaînon* C'_1 *du Complément* qu'on a très longtemps admis qu'il s'agissait d'une seule substance. C'est seulement lorsqu'on a pu séparer nettement *le Complément et la Prothrombine* qu'on a abandonné cette théorie.

Étant donné l'analogie d'un certain nombre de propriétés des deux corps, nous avons jugé intéressant d'examiner si *la Streptokinase* a une action inhibitrice sur *la Prothrombine*. Pour mesurer *le taux de Prothrombine* dans le plasma, nous avons eu recours à *la méthode de Quick*.

La coagulation du sang se fait par la transformation de *la Prothrombine en Thrombine active*, en présence d'ions *Calcium et de Thrombokinase*. Ce processus peut être accéléré par certains facteurs de coagulation (V — VI et VII) ou ralenti par certains inhibiteurs. Si l'on introduit dans un plasma citraté une dose adéquate de suspension de *Thrombokinase et d'ions calciques*, il existe un rapport direct entre le temps de coagulation et le pouvoir coagulant dû au taux de la *Prothrombine, des Activateurs et de l'Antithrombine*.

Le temps qui s'écoule entre l'addition *de Thrombokinase et la coagulation du plasma* a été dénommé par Quick « *temps de Prothrombine* ». On peut exprimer le pouvoir de coagulation du plasma par rapport *au temps de Prothrombine* mesuré grâce à une courbe d'étalonnage. On se réfère, comme valeur normale, à un mélange de plusieurs plasmas d'hommes sains et le temps de coagulation ainsi mesuré équivaut à 100 % de Prothrombine.

En clinique, on détermine le pourcentage *de Prothrombine* au moyen d'une échelle exactement étalonnée par rapport à *la Thrombokinase* employée. Pour tous nos essais, nous avons employé *la Thrombokinase Geigy* qui contient un taux de Calcium suffisant et en principe nous avons travaillé d'après *la méthode de* Quick qui nécessite les réactifs suivants :

Suspension de Thrombokinase:

Un comprimé de *Thrombokinase Geigy* est introduit dans un tube à essai en verre épais et trituré jusqu'à obtention d'une poudre fine qui est transformée en pâte homogène par addition de deux gouttes

d'eau distillée, puis on ajoute 2,5 cc d'eau distillée pour préparer la suspension définitive. Celle-ci se conserve pendant quelques jours à la glacière à 5°. Au moment de l'emploi, il faut chauffer cette suspension à 37° pendant 15 minutes.

Solution de citrate de sodium:

Solution stérile à 3,8 %.

Sang à examiner:

On le recueille par ponction veineuse directement dans une seringue contenant un quart de son volume de la solution citratée. On mélange soigneusement et on centrifuge pendant 7 minutes à 1 700 t/mn pour recueillir le plasma surnageant. Le dosage doit être effectué au cours des deux heures qui suivent le prélèvement du sang. Il faut de toutes façons conserver les échantillons de plasma dans la glacière jusqu'au moment de l'emploi.

Dosage proprement dit:

On introduit 0,1 cc de plasma dans un tube à hémolyse de 10 mm de diamètre et de 10 cm de hauteur; on dispose pendant 2 minutes à 37°. Simultanément on chauffe la suspension de *Thrombokinase* à 37°, on l'introduit dans le tube contenant le plasma, à la dose de 0,2 cc, après l'avoir soigneusement agitée. A ce moment, on déclenche le chronomètre et on mesure le temps jusqu'à la solidification du gel plasmatique. Chaque dosage doit être effectué en double et les deux valeurs obtenues ne doivent pas différer de plus de 0,5 seconde. On retient la valeur moyenne des deux épreuves.

Nous avons établi des courbes témoin au moyen de *sang humain* progressivement dilué *pour les temps de Prothrombine* s'échelonnant entre 5" et 25". On établit un graphique en inscrivant en ordonnée *le temps de Prothrombine des plasmas* examinés et en abscisse le pourcentage de *Prothrombine correspondant*. Toutes ces courbes évoluent suivant un tracé sensiblement identique avec un déplacement de 2 mm environ par seconde. Ces modifications, qui peuvent varier dans les conditions physiologiques entre 14" et 18" correspondant à un pouvoir de coagulation de 100 %, peuvent être ajustées facilement grâce à l' « *échelle de Prothrombine* » *de Geigy*. L'inconvénient de cette méthode réside dans la difficulté qu'il y a à déterminer avec exactitude le moment précis de la formation définitive du gel. A ce sujet, nous nous sommes servi d'un petit crochet en verre que l'on plonge toutes les 5" au fond du tube. Au moment précis de la coagulation, le caillot est entraîné par le crochet. Nous avons effectué de cette façon un grand nombre de dosages et avons pu constater que le terme de la coagulation est difficile à saisir.

C'est pour cette raison que nous avons finalement abandonné cette technique pour recourir au *bain-marie électromagnétique (type Paris-Labo* modèle R 84) dont nous reproduisons ci-contre une photographie :

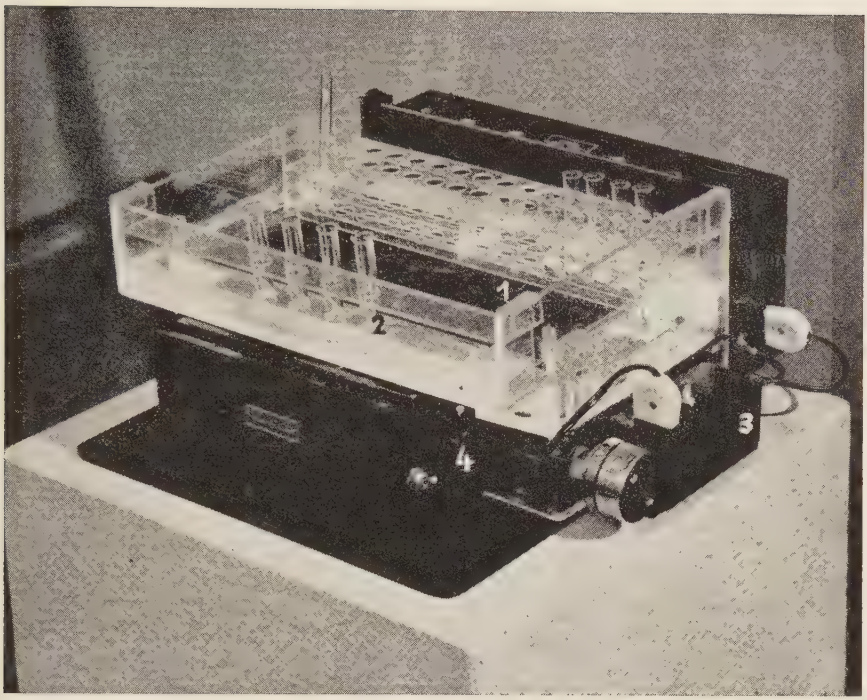

Fig. N° 2

Bain-marie électromagnétique.

Comme on le voit, cet appareil est composé de deux éléments : *un bain-marie à thermostat contenant les supports de tubes et un agitateur électromagnétique*. Pour l'emploi, on chauffe l'eau du bain-marie à 37°, on dispose le portoir des tubes en expérience contenant 0,1 cc de plasma citraté dans la partie antérieure du bain-marie, de sorte que les tubes se trouvent exactement au-dessus de l'agitateur électromagnétique. Nous avons employé des tubes calibrés à fond plat, ayant un diamètre intérieur de 9 mm et un hauteur de 80 mm.

Dans chaque tube on introduit une *petite barre aimantée* qui entre en rotation au moment de la mise en marche de l'appareil.

Le plasma, de son côté, est préalablement chauffé au bain-marie à 37° pendant 2 minutes, puis on ajoute la suspension *de Thrombokinase* à la dose de 0,2 cc, également chauffée à 37° et soigneusement agitée. A ce moment, on déclenche le chronomètre en surveillant la rotation de la barre aimantée. Dès que celle-ci ne bouge plus, on arrête le chronomètre qui indique ainsi le temps de coagulation. Englobée dans un milieu brusquement solide, mais élastique, la barre peut présenter pendant quelques secondes un léger mouvement oscillatoire avant de s'immobiliser complètement, mais de toutes façons, l'arrêt du mouve-

ment circulaire est très net et c'est lui qui traduit l'apparition du caillot.

Au cours de nos recherches, nous avons utilisé du plasma humain et du plasma de lapin frais.

Influence de la Streptokinase sur le plasma humain:

Pour éviter une modification du volume naturel du plasma, nous avons dissous la *Streptokinase lyophilisée* directement dans celui-ci.

Nous introduisons dans 2 cc de plasma environ 2 000 unités de Streptokinase et disposons ce mélange à 37° pendant des temps plus ou moins longs. En même temps, nous préparons une série témoin avec du plasma *sans addition de Streptokinase. Le temps de Prothrombine* est mesuré après 10 — 30 — 60 et 120 minutes, et nous rapportons les résultats ainsi obtenus dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° 12

Série 1	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Streptokinase	15"	100 %	21"	47,5 %	35"	15 %	—	0 %
sans Streptokinase	15"	100 %	15"	100 %	16"	86 %	18"	68 %

On constate qu'après un temps relativement court, il n'y a plus de coagulation. *Sachant que le Fibrinogène plasmatique* joue un rôle aussi important que la Prothrombine dans le processus de coagulation, et que le Fibrinogène est dégradé par l'intervention du système Streptokinase-Profibrinolysine, *il fallait examiner si le rôle essentiel de l'inhibition incombe au Fibrinogène ou plutôt à la Prothrombine.*

Nous avons donc effectué une nouvelle série d'essais, dans laquelle nous avons introduit une dose de *Fibrinogène* supplémentaire au moment du dosage. Nous avons employé le *Fibrinogène de bœuf des Behring-Werke (Marburg—Lahn, Allemagne)* et nous donnons ci-dessous les résultats d'une de ces expériences :

TABLEAU N° 13

Série 2	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Streptokinase et Fibrinogène	16,5"	100 %	22,5"	50 %	36"	17,5 %	—	0 %
sans Streptokinase ni Fibrinogène	16,5"	100 %	16,5"	100 %	17,5"	88 %	19"	73 %

Ces résultats montrent qu'il n'existe pas de différence sensible entre les deux expériences; ou bien le *Fibrinogène* est dégradé par la Fibrinolysine activée à l'aide de la *Streptokinase* d'une façon beaucoup plus lente que *la Prothrombine*, ou alors la *méthode de Quick* nécessite seulement des traces de *Fibrinogène.*

C'est pour cette raison que nous avons répété l'expérience en faisant agir cette fois *la Fibrinolysine Behring à la place de la Streptokinase, sur la Prothrombine.* Nous pouvons ainsi contrôler si *la Streptokinase* influence éventuellement la transformation de la Profibrinolysine en Fibrinolysine. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 14

Série 3	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Fibrinolysine	16"	100 %	27"	32 %	—	0 %	—	0 %
sans Fibrinolysine	16"	100 %	16"	100 %	16,5"	94 %	18,5"	72 %

Il ressort de ces essais le même fait que nous avons déjà constaté lors des essais analogues avec le Complément, c'est-à-dire *l'inactivation de la Prothrombine par la Fibrinolysine est plus rapide qu'avec la Streptokinase.* En principe, ce fait peut s'expliquer, puisque la chaîne de transformation est ainsi plus courte par suite de l'élimination de la phase de transformation de la Profibrinolysine en Fibrinolysine.

Influence de l'Hyaluronidase sur le plasma humain:

Etant donné que *l'Hyaluronidase* est également *une exotoxine des Streptocoques hémolytiques, comme la Streptokinase*, nous avons jugé intéressant d'étudier son action sur *la Prothrombine.* Pour nos essais nous avons employé *l'Hyaluronidase Cruet*, à raison de 100 unités TRU /2 cc de plasma humain. Le protocole expérimental était identique à celui de *la Streptokinase* et nous exprimons ci-dessous les résultats obtenus :

TABLEAU N° 15

Série 4	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Hyaluronidase	18"	100 %	18"	100 %	19"	89 %	20"	80 %
sans Hyaluronidase	18"	100 %	18"	100 %	18,5"	94 %	20,5"	75 %

Il ressort de ces résultats que *l'Hyaluronidase* n'a aucune influence sur le système Profibrinolysine-Fibrinolysine, ce qui prouve qu'elle n'a aucun pouvoir activateur sur *la Profibrinolysine.*

Influence de la Streptokinase sur le plasma de lapin:

Le plasma de lapin présente « *un temps de Prothrombine* » beaucoup plus court que le plasma humain et d'après la littérature spécialisée il ne doit contenir que peu ou pas du tout *de Fibrinolysine activable par la Streptokinase.* Ce fait paraît imputable à l'absence d'un pro-activateur, comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre III.

Comme dans nos essais avec le plasma humain nous avons ici aussi fait agir 2 000 unités *de Streptokinase* sur 2 cc de plasma de lapin. Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 16

Série 5	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Streptokinase	6''	100 %	7,5''	60 %	12''	21 %	–	0 %
sans Streptokinase	6''	100 %	6''	100 %	6''	100 %	6,5''	85 %

Contrairement à notre attente, nous constatons ici une inactivation du plasma de lapin sous l'influence de *la Streptokinase :* elle est cependant plus lente que pour le plasma humain. On peut en conclure que *le plasma de lapin*, contrairement à l'opinion admise jusqu'à présent, doit contenir *le proactivateur agissant sur la Profibrinolysine.* L'activation de la *Profibrinolysine et de la Fibrinolysine* est ainsi possible par *la Streptokinase.* Frey a déjà fait une constatation analogue, puisqu'il a pu obtenir à l'aide de *la Streptokinase* une lyse du caillot de sang de lapin.

Dans le même ordre d'idées, nous avons examiné l'action de *la Fibrinolysine* sur le plasma et ceci en introduisant dans notre substrat réactionnel une dose de *Fibrinogène supplémentaire.* Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 17

Série 6	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Fibrinolysine	6''	100 %	10,5''	29 %	—	0 %	—	0 %
sans Fibrinolysine	6''	100 %	6''	100 %	6,5''	85 %	6,5''	85 %

TABLEAU N° 18

Série 7	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Streptokinase et Fibrinogène	6"	100 %	7"	70 %	11"	26 %	—	0 %
sans Streptokinase ni Fibrinogène	6"	100 %	6,5"	85 %	10,5"	29 %	—	0 %

Comme on le voit, l'addition de *Fibrinogène* n'a aucune influence sur la coagulation, ce qui prouve que *la Streptokinase* n'a aucune action sur *le Fibrinogène.*

Nous avons ensuite examiné l'influence de *l'Hyalurinodase sur le plasma de lapin*, en introduisant 100 TRU dans 2 cc de plasma :

TABLEAU N° 19

Série 8	Temps et pourcentage de Prothrombine après :							
	0 minute		30 minutes		60 minutes		120 minutes	
	T	%	T	%	T	%	T	%
avec Hyaluronidase	6"	100 %	6"	100 %	6,5"	85 %	6,5"	85 %
sans Hyaluronidase	6"	100 %	6"	100 %	6"	100 %	6,5"	85 %

Il ressort de ces résultats que *l'Hyaluronidase* n'a aucun effet inhibiteur sur *la Prothrombine.* Nous pouvons par conséquent conclure que *la Streptokinase* est capable de détruire, à des degrés plus ou moins marqués, *la Prothrombine du plasma de l'homme et du lapin*, ce que *l'Hyaluronidase* est incapable de faire.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de notre travail était d'étudier l'influence de *la Streptokinase, enzyme d'adaptation des Streptocoques*, sur deux éléments protéiques du sang : *la Prothrombine et le Complément.*

Nos recherches ont été limitées à des essais « *in vitro* » et nous pensons qu'elles pourront servir de base à des études ultérieures « *in vivo* ».

Nous donnons par conséquent dans *la partie historique* nos connaissances *sur le Complément et ses divers composants*, ainsi que sur *la Prothrombine* et le processus de la coagulation du sang.

Nous rapportons les différents travaux ayant trait aux relations entre *la Prothrombine et le Complément.* Dans le cadre de notre travail, il était nécessaire que nous décrivions *les réactions de la fibrinolyse.* Nous étions ainsi obligé d'insister sur *la Fibrinolysine, les activateurs du système fibrinolytique, la Streptokinase et la Streptodornase* qui tous jouent un rôle important dans ce processus de lyse.

Dans nos travaux personnels, nous avons tout d'abord mis au point une méthode de dosage rigoureuse *du Complément.* A ce sujet, nous avons eu recours à la méthode de KROGH et MORSE, modifiée par ROULIER; nous avons ainsi pu déterminer exactement *le taux de Complément* dans le sérum d'homme et de cobaye, grâce à l'emploi d'une cellule photoélectrique. Pour le dernier, nous avons eu recours à un produit lyophilisé (Co I.P.) et avons ainsi constaté que *le taux de Complément* varie énormément d'une ampoule à l'autre dans une même boîte de ces préparations.

Nous avons ensuite étudié l'influence *de la Streptokinase sur le taux de Complément* du sérum d'homme et de cobaye. En ce qui concerne le premier, nous avons constaté qu'un contact de deux heures suffit pour inactiver intégralement *le pouvoir hémolytique du Complément.* Nous avons pu démontrer l'importance dans ce phénomène de la présence de la *Profibrinolysine* à un taux suffisant.

Une *inactivation du Complément* par la Streptokinase dans le sérum de cobaye pur était impossible. C'est pourquoi nous avons ajouté *au sérum de cobaye du sérum humain* préalablement inactivé par la chaleur. Nous avons ainsi pu prouver que le sérum humain employé à des doses déterminées fournit le *proactivateur indispensable pour permettre à la Streptokinase d'inactiver le Complément.*

Par la suite, nous avons pu démontrer que le *sérum humain inactivé* par la chaleur ne constitue pas la meilleure source *de Profibrinolysine ;*

nos expériences ultérieures nous ont montré que *le sérum humain frais* se prêtait beaucoup mieux à cette réaction.

Nous avons ensuite étudié *l'influence de la température* sur le phénomène d'inactivation par la *Streptokinase* et avons constaté que celle-ci ne s'effectuait pas à 0°, qu'elle augmente proportionnellement avec la température et qu'elle est optimale à 37°.

La concentration en *ions calciques* n'a pas d'influence directe sur la réaction d'inactivation par la *Streptokinase*.

Nous avons jugé nécessaire d'étudier *le point d'attaque de la Streptokinase sur le Complément*, en scindant celui-ci en ses quatre chaînons. A ce sujet, nous avons employé les réactifs R_1, R_2, R_3 et R_4 du Complément.

On sait que les phénomènes d'hémolyse ne sont pas uniquement dus au *Complément*, mais peuvent aussi être imputables à *la Fibrinolysine*. Nous avons donc étudié l'influence de celle-ci à côté de *la Streptokinase*. A la suite de ces expériences, nous avons constaté que l'action de *la Streptokinase sur le Complément* s'exerce à travers un proactivateur sérique activant *la Profibrinolysine* pour la transformer en *Fibrinolysine*. L'inhibition du Complément se manifeste ensuite en touchant en premier lieu le chaînon C'_1, puis C'_4 et C'_2. Le composant C'_3 est plus résistant à l'action de *la Streptokinase*.

Finalement, nous avons étudié l'influence de *la Streptokinase sur le taux de Prothrombine du plasma d'homme et de lapin*. Après de multiples esssais, nous avons eu recours *au bain-marie électromagnétique Paris-Labo* qui nous a permis d'obtenir des résultats concordants. A la suite de ces travaux, nous avons également pu prouver que l'action de la *Streptokinase* s'effectue par une activation de *la Profibrinolysine*. Nous avons ainsi démontré qu'il existe un rapport direct entre *la Prothrombine et le Complément*. Dans des expériences supplémentaires nous avons vu que *l'Hyaluronidase, autre exoenzyme streptococcique*, ne possède aucun pouvoir inhibiteur sur la *Prothrombine*. On voit ainsi que l'action de *la Streptokinase* est strictement spécifique et se manifeste à la fois *sur la Prothrombine et sur le Complément*.

Ces expériences sur le processus hémolytique nous ont permis de démontrer qu'il existe dans *le plasma de lapin suffisamment de proactivateur pour la formation de la Fibrinolysine*, permettant ensuite de détruire un taux très élevé *de Prothrombine*, fait qui va à l'encontre de l'opinion de la plupart des auteurs.

Nous tenons à mentionner un fait qui nous paraît important en ce qui concerne les infections à Streptocoques hémolytiques. La Streptokinase que ces bactéries peuvent élaborer inhibe plus ou moins l'activité alexique du sang et ainsi un des principaux facteurs de défense antimicrobienne est détruit. D'autre part, cette Streptokinase, stimulant le système Profibrinolysine-Fibrinolysine, contribue « in vivo » à la destruction de la Prothrombine, ce qui peut occasionner une hypocoagulabilité marquée du sang pouvant contribuer à des accidents hémorragiques et vasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

(8) Astrup T. — Blood, 1956, 11, 781-784.

(24) Bloch J. C. — *Influence de l'Acide pantothénique sur le taux alexique du sérum de lapin.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1960.

(20) Brand — Berl. Klin. Woch., 1907, 34, 107.

(14) Büsing et Zuzak — Zeit. f. Imm. Forsch., 1943, 102, 401.

(36) Mac Carty W. R. — Journ. exp. Med., 1948, 88, 181.

(7) Christensen T. R. — Journ. of clin. Invest., 1949, 28, 163.

(33) Christensen L. R. — Journ. gen. Physiol., 1945, 28, 336/559.

(22) Coca — Imm. Forsch., 1914, 21, 624.

(19) Cohn — Amer. Chem. Soc., 1940, 62, 3886.

(18) Ecker — Journ. Immunol., 1938, 34, 39-45.

(3) Felix, Bendl et Roka — Zeit. f. phys. Chem., 1949, 284, 198.

(16) Ferrata — Klin. Woch., 1907, 366, 422.

(35) Fletcher et Johnson — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1957, 94, 232.

(1) Frey W. — *Streptokinase et Antistreptokinase.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1959.

(30) Fuchs et Falkenhausen — Biochem. Zeit., 1943, 102, 401.

(15) Gürwitz — Imm. Forsch., 1931, 72, 169.

(26) Hegedius et Greiner — Imm. Forsch., 1938, 1, 92.

(25) Kossowitz — C. R. Soc. Biol., 1938, 170, 1944.

(38) Krogh (von) M. — Journ. Inf. Dis., 1915, 19, 452.

(29) Lasch et Roka — Hope Seyler's Zeit. f. physiol. Chem., 1953, 35, 294.

(34) Lewis J. et Ferguson J. — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1951, 70, 184.

(12) Maignon — C. R. Soc. Biol., 1942, 136, 718.

(11) Mandelbaum — Münch. Med. Woch., 1917, 92, 277.

(4) Marx, Bayerle et Skippe — Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharm., 1949, 206, 334.

(32) Milstone H. — Journ. of Immunol., 1941, 42. 109.

(10) Moison — Journ. Immunol., 1922, 7, 435.

(39) Morse S. — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1921, 19, 17.

(21) Pillemer — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1940, 45, 130.

(27) Quick A. — Journ. Physiol., 1943, 140, 212.

(13) Rice et Boulanger — Journ. Immunol., 1952, 68, 673.

(31) Rice et Boulanger — Canad. Journ. of comp. Med., 1950, 14, 296.

(9) Roulier R. — Thèse Doct. Méd., Montpellier 1958.

(17) Sachs — *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Berlin, 1929, p. 875.

(40) Sartory A., Sartory R. et Meyer J. — *Microbiologie Pratique*, Maloine, Paris, 1950.

(28) Seegers — Arch. Biol., 1945, 6, 85.

(2) Slätis — Scand. Journ. of Clin. and Lab. Invest., 1958, 10, 33.

(37) Tillet W. S. — Journ. of clin. Invest., 1955, 34, 109.

(6) Tillet W. S. et Garner — Journ. of exp. Med., 1933, 58, 485.

(5) Vinet A. et Meunier P. — C. R. Soc. Biol., 1944, 138, 58.

(23) Whitehead — Biochem. Journ., 1925, 19, 618.

Vu, Strasbourg, le 8 novembre 1960

Le Président du Jury,
R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 9 novembre 1960

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
P. DUQUÉNOIS

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 14 novembre 1960.

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 8

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Généralités sur le Complément 9

Les composants du Complément 9
Propriétés des quatre composants du Complément 11
Le chaînon-levure 12
Le chaînon-ammoniaque 14
Relations entre les différents composants du Complément 15

CHAPITRE II

Généralités sur la coagulation du sang 17

Le temps de coagulation 17
Bases du dosage de la Prothrombine 18
Relations entre la Prothrombine et le Complément 19

CHAPITRE III

Généralités sur la fibrinolyse et la fibrinolysine 21

La Streptokinase 22
La Streptodornase 22
Emploi thérapeutique 23

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

Titrage du Complément à 50 % d'hémolyse 27

Principe de la titration 27
Préparation et standardisation de la suspension d'hématies de mouton .. 28
Titrage du Complément 30
Établissement de la courbe-étalon 31

CHAPITRE V

Dosage du Complément dans des sérums d'hommes et de cobaye 35

CHAPITRE VI

Influence de la Streptokinase sur le taux de Complément du sérum humain et de cobaye 37

Influence de la Streptokinase sur le taux de Complément du sérum de cobaye 39
Influence de la Streptokinase sur un mélange de sérum d'homme et de cobaye 40
Influence de la température sur l'activité de la Streptokinase 42
Influence de la concentration en ions Calcium sur l'action inhibitrice de la Streptokinase 43

CHAPITRE VII

Influence de la Streptokinase sur les divers composants du Complément 45

Préparation des différents réactifs alexiques 45
Mode opératoire 46

CHAPITRE VIII

Inactivation de la Prothrombine par la Streptokinase et l'Hyaluronidase 49

Dosage proprement dit 50
Influence de la Streptokinase sur le plasma humain 52
Influence de l'Hyaluronidase sur le plasma humain 53
Influence de la Streptokinase sur le plasma de lapin 54

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 57

BIBLIOGRAPHIE 59

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

*

Dépôt légal N° 6134/1960